

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 909**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2003 E 15158266 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2913407**

54 Título: **Método para detectar ARNm del virus del papiloma humano**

30 Prioridad:

**07.01.2002 GB 0200239**

**19.06.2002 GB 0214124**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.02.2018**

73 Titular/es:

**PRETECT AS (100.0%)**

**Industriveien 8**

**3490 Klokkarstua, NO**

72 Inventor/es:

**KARLSEN, FRANK**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 654 909 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para detectar ARNm del virus del papiloma humano

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos *in vitro* de cribado de sujetos humanos con el fin de evaluar su riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino.

10 **Antecedentes de la invención**

El carcinoma de cuello uterino es una de las enfermedades malignas más comunes en todo el mundo y es una de las causas principales de morbilidad y mortalidad entre las mujeres (Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J. (1993) *Int. J. Cancer*, 54: 594-606; Pisani, P., Parkin, D.M., Ferlay, J. (1993) *Int. J. Cancer*, 55: 891-903). En 1996 se pronosticaron 15.700 nuevos casos de cáncer de cuello uterino invasivo en Estados Unidos, y la Organización Mundial de la Salud ha calculado que la incidencia mundial anual es de 450.000 (1990). La tasa de incidencia anual difiere en las diferentes partes del mundo, variando de 7,6 por 100.000 en Asia occidental a 46,8 por 100.000 en África del Sur (Parkin y col., 1993, ídem).

20 El concepto actual del carcinoma de cuello uterino es que el mismo es una enfermedad de múltiples etapas, desarrollándose a menudo a lo largo de un periodo de 10-25 años. El carcinoma del cuello uterino invasivo de células escamosas está representado por penetración a través de la lámina basal e invasión del estroma o la lámina propia epitelial. El curso clínico del carcinoma de cuello uterino presenta una variación considerable. El pronóstico se ha relacionado con la etapa clínica, la implicación de nódulos linfáticos, la masa tumoral primaria, el tipo histológico, la profundidad de la invasión y la permeación linfática (Delgado, G. y col., (1990) *Gynecol. Oncol.*, 38: 352-357).  
25 Algunas pacientes con características tumorales menos favorables tienen un desenlace relativamente bueno, mientras que otras sufren un desenlace fatal de una enfermedad inicialmente limitada. Esto muestra una clara necesidad de marcadores adicionales para caracterizar adicionalmente carcinomas de cuello uterino recién diagnosticados, con el fin de administrar una terapia adaptada al riesgo (Ikenberg, H. y col., *Int. J. Cancer*, 59: 322-6, 1994).

La epidemiología del cáncer de cuello uterino ha mostrado una fuerte asociación con patrones religiosos, maritales y sexuales. Casi 100 estudios caso-control han examinado la relación entre el VPH y la neoplasia de cuello uterino y casi todos han encontrado asociaciones positivas (monografías de la IARC, 1995). La asociación es potente, consistente y específica para un número limitado de tipos víricos (Muñoz, N., Bosch, F.X. (1992) *VPH and cervical neoplasia: review of case-control and cohort studies. IARC Sci. Publ.*, 251-261). Entre los estudios más informativos, se han observado fuertes asociaciones con el ADN de VPH 16 con una consistencia notable para cáncer invasivo y lesiones CIN de grado alto, descartando la posibilidad de que esta asociación pueda explicarse por el azar, sesgo o confusión (monografías de la IARC, 1995). Pruebas indirectas indicaron que el ADN de VPH detectado en las células cancerosas es un buen marcador del papel de la infección por VPH en las etapas tempranas de la carcinogénesis. Se ha descrito una relación dosis-respuesta entre un incremento de la carga vírica y el riesgo de carcinoma de cuello uterino (Muñoz y Bosch, 1992, ídem). En algunas series más grandes hasta un 100 % de los tumores eran positivos para VPH, pero la existencia de carcinomas de cuello uterino negativos para el virus está todavía en debate (Meijer, C.J. y col. (1992) *Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening. IARC Sci. Publ.*, 271-281; Das, B.C. y col., (1993) *Cancer*, 72: 147-153).

Los tipos de VPH más frecuentes encontrados en carcinomas de cuello uterino de células escamosas son VPH 16 (41 %-86 %) y 18 (2 %-22 %). Además, se han encontrado también VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 61, 66 y 68 (monografías de la IARC, 1995). En la Conferencia Internacional VPH2000 de Barcelona, se definieron VPH 16, 18, 31 y 45 como de alto riesgo, mientras que VPH 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 68 fueron definidos como de riesgo intermedio (Keerti, V., Shah. P71). Los 13 VPHs de alto riesgo más los de riesgo intermedio son a menudo referidos todos juntos como tipos de VPH asociados a cáncer.

55 Varios estudios han explorado el papel potencial del análisis de VPH en el cribado de cáncer de cuello uterino (véase Cuzick y col., *A systematic review of the role of human papillomavirus testing withing a cervical screening programme. Health Technol. Assess.*, 3: 14, 1999).

60 Reid y col. (Reid, R. y col. (1991) *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 164: 1461-1469) fueron los primeros en demostrar un papel para el análisis de VPH en un contexto de cribado. Este estudio se realizó en mujeres de alto riesgo procedentes de clínicas de enfermedades transmitidas sexualmente y de ginecólogos especialistas, y utilizó una hibridación de transferencia Southern (de baja rigurosidad) sensible para la detección del VPH. Participaron un total de 1012 mujeres y la cervicografía se consideró también como un posible auxiliar para la citología. Se encontraron en total 23 lesiones CIN II/III, pero solamente 12 se detectaron por citología (sensibilidad del 52 %, especificidad del 92 %). El análisis de VPH encontró 16 lesiones de grado alto.

- 5 Bauer y col. (Bauer, H.M. y col. (1991) *JAMA*, 265: 472-477) informan de un estudio temprano basado en PCR utilizando cebadores MY09/11 (Manos, M. y col. (1990) *Lancet*, 335: 734) en mujeres jóvenes que acudieron para que les realizaran frotis rutinarios (estudiantes universitarias). Encontraron una tasa positiva del 46 % en 467 mujeres, que era mucho más elevada que para el ensayo de transferencia de manchas (11 %).
- 10 En un estudio utilizando PCR con cebadores GP5/6 (van der Brule, A.J. y col. (1990) *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2739-2743) van der Brule y col. (van der Brule, A.J. y col. (1991) *Int. J. Cancer*, 48: 404-408) mostraron una correlación muy potente entre la positividad para VPH y la neoplasia de cuello uterino según se determinó por citología. En mujeres mayores (35-55 años de edad) con citología negativa la tasa de positividad para VPH era únicamente del 3,5 %, y ésta se redujo al 1,5 % si se consideraban únicamente los tipos 16, 18, 31 y 33, mientras que las mujeres con carcinoma histológico *in situ* eran todas positivas para VPH y el 90 % tenía uno de los cuatro tipos anteriores. Las mujeres con anomalías citológicas menos graves tenían menores tasas de positividad para VPH de manera gradual, mostrándose una clara tendencia.
- 15 Roda Housman y col. (Roda Housman, A.M. y col. (1994) *Int. J. Cancer*, 56: 802-806) extendieron todas estas observaciones examinando a 1373 mujeres más con frotis anormales. Este estudio confirmó también una tasa de positividad creciente con la gravedad creciente de los resultados de los frotis. Observaron también que el nivel de heterogeneidad del VPH disminuía desde 22 tipos para los frotis de grado bajo hasta diez tipos de "alto riesgo" para los frotis de grado alto. Este artículo no incluía mujeres citológicamente negativas, ni tampoco ninguna enfermedad citológica confirmada histológicamente.
- 20 Cuzick y col. (Cuzick, J. y col. (1992) *Lancet*, 340: 112-113; Cuzick, J. y col. (1994) *Br. J. Cancer*, 69: 167-171) fueron los primeros en describir que el análisis del VPH proporcionaba una información útil para la clasificación de anomalías citológicas detectadas durante un cribado aleatorio. En un estudio de 133 mujeres, remitidas para colposcopia, encontraron un valor predictivo positivo del 42 %, que era similar al de la discariosis moderada. Los resultados fueron más sorprendentes para VPH 16, donde se encontró que 39 de 42 mujeres positivas para VPH 16 tenían un CIN de grado alto en la biopsia. Este estudio resaltaba la importancia de la determinación de la carga vírica y consideraba únicamente como positivos los niveles elevados de los tipos de alto riesgo.
- 25 Cox y col. (Cox, J.T. y col. (1995) *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 172: 946-954) demostraron un papel del análisis de VPH utilizando el sistema de Captura Híbrida (Hybrid Capture™) (DIGENE Corporation, Gaithersburg, MD, EE.UU.) para la clasificación de mujeres con frotis dudosos. Este ensayo se realizó en 217 mujeres procedentes de un servicio de remisión universitario y se encontró una sensibilidad del 93 % para CINII/III en comparación con un 73 % para citología repetida. Se encontró que una carga vírica elevada mejoraba además el funcionamiento del ensayo reduciendo los falsos positivos. Cuando se tomó como valor de corte 5 RLU, se encontró un PPV del 24 % aproximadamente sin pérdida de la sensibilidad.
- 30 Cuzick y col. (Cuzick, J. y col. (1995) *Lancet*, 345: 1533-1536) evaluaron el análisis de VPH en el contexto de un cribado primario en 1985 mujeres que acudieron a un cribado rutinario en una clínica de planificación familiar. La sensibilidad utilizando PCR específica de tipo para los cuatro tipos comunes de VPH (75 %) era superior a la de la citología (46 %), y el PPV para un ensayo de VPH positivo (42 %) era similar al obtenido para una discariosis moderada (43 %).
- 35 El documento WO 91/08312 describe métodos para determinar el pronóstico de individuos infectados con VPH que comprenden la medida del nivel de actividad VPH mediante la detección de transcritos de todos o de una porción de los genes E6 y/o E7 de VPH en una muestra y la comparación de las medidas de la actividad VPH con una relación previamente establecida entre la actividad y el riesgo de progresión hacia una displasia de cuello uterino grave o hacia carcinoma de cuello uterino.
- 40 El documento WO 99/29890 describe métodos para determinar la infección por VPH basados en la medida y en el análisis de los niveles de expresión génica. En particular, WO 99/29890 describe métodos que están basados en la medida de los niveles de expresión de dos o más genes del VPH (por ejemplo, E6, E7, L1 y E2 del VPH) y la comparación posterior de la tasa de expresión de combinaciones de estos genes para proporcionar una indicación de la etapa de la enfermedad basada en VPH en una paciente.
- 45 Nakagawa y col. (2000; *Journal of Medical Virology*; 62 (2); 251-258) informan de un ensayo en el que se identificaron transcritos de E6 y transcritos de E7 en carcinomas cervicales.
- 50 Forslund y col. (1997; *Journal of Virological Methods*; 69 (1-2); 209-222) describen un método de medición de cantidades de ARNm víricos con respecto al ADN vírico en muestras de células de diversos grados de neoplasia de cuello uterino, para determinar el nivel global de expresión vírica.
- 55 Shirasawa y col. (1991; *Virology*; 184 (2); 795-798) describen un método de análisis de los patrones de corte y empalme de los transcritos de E6-E7 en lesiones premalignas del cuello uterino.
- 60
- 65

## Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método *in vitro* de cribado de sujetos humanos para evaluar su riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino, método que comprende el cribado del sujeto para la expresión de transcritos de ARNm de longitud completa del gen E6 de VPH y la clasificación del sujeto en una de dos categorías de riesgo para el desarrollo de carcinoma de cuello uterino basándose en la expresión de dicho ARNm de E6, en el que los individuos positivos para la expresión de ARNm de E6 se califican como portadores de VPH integrado o de un genoma de VPH episómico modificado y, por tanto, se clasifican como de alto riesgo para el desarrollo de carcinoma de cuello uterino, mientras que los individuos negativos para la expresión de ARNm de E6 se califican como no portadores de VPH integrado o de un genoma de VPH episómico modificado y, por tanto, se clasifican como sin riesgo detectable para el desarrollo de carcinoma de cuello uterino.

Los presentes inventores han determinado que es posible realizar una determinación clínicamente útil de la enfermedad asociada al VPH basada únicamente en una simple determinación positiva/negativa de la expresión de transcritos de ARNm de L1 y E6 del VPH, sin requerir medidas cuantitativas precisas de los niveles de expresión ni la determinación de diferencias en los niveles de expresión de los dos transcritos. Este método es técnicamente sencillo y es susceptible de automatización en un formato de rendimiento medio a elevado. Además, sobre la base de los resultados obtenidos usando el método de la invención los inventores han definido un nuevo esquema de clasificación de pacientes sobre la base del riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino que se relaciona con cambios moleculares relevantes para la enfermedad en el patrón de la expresión de genes del VPH y que es independiente de la clasificación CIN.

Por tanto, en el presente documento se describe un método *in vitro* de cribado de sujetos humanos para determinar su riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino, que comprende la selección por la expresión de transcritos de ARNm del gen L1 y del gen E6 del virus del papiloma humano, en el que los sujetos positivos para la expresión de ARNm de L1 y/o de E6 de longitud completa se clasifican como con riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino.

Un resultado positivo en el cribado con el método está indicado por la expresión positiva de ARNm de L1 y/o ARNm de E6 en células del cuello uterino. La expresión positiva de cada uno de estos ARNm o de ambos ARNm se considera una indicación de que el sujeto tiene "riesgo" de desarrollar carcinoma de cuello uterino. Las mujeres que expresan ARNm de E6 tienen un riesgo elevado de desarrollar cambios celulares, ya que los E6 y E7 oncogénicos se unen a proteínas reguladoras del ciclo celular y actúan como activadores de la proliferación celular. La expresión clara de ARNm de E6 proporciona una indicación directa de cambios celulares en el cuello uterino. La expresión de ARNm de L1, con o sin la expresión de ARNm de E6, es también indicativa de la presencia de un VPH activo.

En el contexto más amplio del cribado de cuello uterino, las mujeres identificadas como positivas para la expresión de ARNm de L1 y/o E6, pueden seleccionarse para una investigación posterior, utilizando, por ejemplo, citología. Por tanto, en un nivel, los métodos descritos pueden proporcionar un medio técnico sencillo de precribado de una población de mujeres con el fin de identificar a aquellos sujetos positivos para VPH que pueden seleccionarse para una investigación posterior.

Los métodos que se describen en el presente documento pueden utilizarse para clasificar sujetos en cuatro clases diferentes de riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino sobre la base de la valoración positiva/negativa de la expresión del ARNm de L1 y E6.

En consecuencia, también se describe un método *in vitro* de cribado de sujetos humanos con el fin de determinar su riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino, que comprende la selección del sujeto por la expresión de transcritos de ARNm del gen L1 del VPH y de transcritos de ARNm del gen E6 del VPH, y la clasificación del sujeto en una de cuatro categorías de riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino sobre la base de la expresión de ARNm de L1 y/o E6 de acuerdo con la clasificación siguiente:

Categoría de riesgo 1: sujetos negativos para la expresión de ARNm de L1 pero positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 o 68. Aquellos individuos positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de VPH 16, 18, 31 o 33 se clasifican como de riesgo más elevado, en comparación, por ejemplo, con los individuos negativos para estos tipos, pero positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de VPH 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 o 68.

Categoría de riesgo 2: sujetos positivos para la expresión de ARNm de L1 y positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 o 68. Aquellos individuos positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de VPH 16, 18, 31 o 33 se clasifican como de riesgo más elevado, en comparación, por ejemplo, con los individuos negativos para estos tipos, pero positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de VPH 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 o 68.

Categoría de riesgo 3: sujetos positivos para la expresión de ARNm de L1 pero negativos para la expresión de ARNm de E6 de los tipos de VPH asociados a cáncer (por ejemplo, negativos para la expresión de ARNm de E6 de los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 y 68).

5 Categoría de riesgo 4: sujetos negativos para la expresión de ARNm de L1 y negativos para la expresión de ARNm de E6.

10 La expresión positiva puede indicarse por la presencia de más de 50 copias del transcrito por ml (o volumen total de la muestra) y la expresión negativa puede indicarse por la presencia de menos de 1 copia del transcrito por ml (o volumen total de la muestra).

15 La clasificación anterior se basa en acontecimientos moleculares que son relevantes para el riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino y es independiente del estatus CIN de los sujetos. Por tanto, este método de clasificación puede proporcionar una alternativa a la utilización de citología en el cribado rutinario de mujeres para identificar aquéllas con riesgo potencial de desarrollar carcinoma de cuello uterino. El método también puede utilizarse como auxiliar de la citología, por ejemplo, como un ensayo de confirmación para confirmar la determinación del riesgo realizada sobre la base de la citología.

20 Las mujeres positivas para la expresión del ARNm de E6 de alto riesgo de uno de los tipos de VPH 16, 18, 31 o 33, pero negativas para la expresión de L1, están dentro del nivel de riesgo más elevado de desarrollar cambios celulares y anormalidades celulares graves. Esto es debido al hecho de que un resultado negativo para la expresión de ARNm de L1 es indicativo directamente de un VPH integrado, y por tanto de una mayor probabilidad de una expresión elevada y constante de E6 y E7. La integración de un virus en el genoma humano tiene también un impacto directo sobre la estabilidad de las células. La integración del VPH reduce también la posibilidad de regresión de los cambios celulares.

30 Las mujeres positivas para la expresión de ARNm de E6 de uno de los tipos de VPH 16, 18, 31 o 33 y positivas para la expresión de ARNm de L1, tienen una expresión de VPH de "alto riesgo" y todavía es posible que el VPH se haya integrado. Sin embargo, el riesgo de estas mujeres no es clasificado como tan elevado como el de las mujeres que son negativas para L1 y positivas para E6, ya que existe una probabilidad razonable de que no tengan VPH integrado.

35 Las mujeres negativas para la expresión de ARNm de E6 de los tipos de VPH 16, 18, 31 o 33 pero positivas para la expresión de ARNm de E6 de otro tipo de VPH, por ejemplo, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 y 68, todavía se consideran de "riesgo" y, por tanto, pueden situarse en las categorías de riesgo 1 o 2 (según se definieron anteriormente) dependiendo de si son positivas o negativas para la expresión de ARNm de L1.

40 Las mujeres positivas para ARNm de L1 pero negativas para ARNm de E6 se clasifican como de riesgo moderado. Puede haber tipos de VPH de alto riesgo en la muestra y la expresión de L1 es indicativa de actividad lítica. Puede haber también tipos de VPH integrados pero únicamente con virus que son poco frecuentes. Sin embargo, la detección de actividad lítica puede mostrar que la célula podrá desarrollar pronto ciertos cambios.

45 En el contexto más amplio del cribado de cuello uterino, los métodos que se describen en el presente documento pueden utilizarse para clasificar mujeres de acuerdo con el riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino y proporcionar por tanto una base para tomar decisiones concernientes al tratamiento y/o al cribado posterior. A manera de ejemplo: mujeres dentro de la categoría de riesgo 1, particularmente las que presentan expresión positiva de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de VPH 16, 18, 31 o 33, podrían identificarse como requeridoras de una "acción inmediata", significando conización o colposcopia, incluyendo una biopsia e histología.

50 Las mujeres dentro de la categoría de riesgo 2, según se ha definido anteriormente, podrían clasificarse como requeridoras de atención inmediata, significando colposcopia sola o colposcopia incluyendo una biopsia e histología.

55 Las mujeres dentro de la categoría de riesgo 3, según se ha definido anteriormente, podrían clasificarse como requeridoras de un nuevo análisis inmediato, significando que deben ser convocadas de nuevo para un análisis adicional con el fin de determinar la expresión de VPH ya sea inmediatamente o después de un intervalo relativamente corto, por ejemplo, seis meses.

60 Las mujeres dentro de la categoría de riesgo 4, según se ha definido anteriormente, podrían devolverse al programa de cribado, con el fin de ser analizadas de nuevo para determinar la expresión de VPH en una fecha posterior.

65 También se describe un método *in vitro* de cribado de sujetos humanos para determinar la presencia de VPH integrado o de un genoma de VPH episómico modificado, método que comprende la selección del sujeto por la expresión de transcritos de ARNm del gen L1 y del gen E6 del virus del papiloma humano, en el cual los sujetos negativos para la expresión de ARNm de L1 pero positivos para la expresión de ARNm de E6 se clasifican como portadores de VPH integrado.

La expresión "VPH integrado" se refiere a un genoma de VPH que está integrado en el genoma humano.

La expresión "genoma de VPH episómico modificado" significa un genoma de VPH que está retenido en una célula del sujeto humano como un episoma, esto es que no está integrado en el genoma humano, y que lleva una modificación en comparación con el genoma de VPH de tipo salvaje equivalente, modificación que da lugar a la expresión constitutiva o persistente de transcritos de los genes E6 y/o E7. La "modificación" será normalmente una delección, una multimerización o concatemerización del episoma, una reordenación del episoma, etc., que afecte a la regulación de la expresión de E6/E7.

Según se ha mencionado anteriormente, la presencia de VPH integrado o de un genoma de VPH episómico modificado está indicada por un resultado negativo para la expresión de ARNm de L1, junto con un resultado positivo para la expresión de ARNm de E6 en células del cuello uterino. Por tanto, la capacidad para predecir la presencia de VPH integrado o de un genoma de VPH episómico modificado en este ensayo, depende críticamente de la capacidad para valorar un resultado negativo para la expresión de ARNm de L1. Esto requiere una técnica de detección que tenga una sensibilidad máxima y que produzca además mínimos resultados negativos falsos. Esto puede conseguirse utilizando una técnica de amplificación sensible y de detección en tiempo real sensible para seleccionar por la presencia o ausencia de ARNm de L1. La técnica más preferida es la amplificación por NASBA en tiempo real utilizando sondas moleculares fluorescentes ("balizas"), según se describe por Leone y col., *Nucleic Acids Research*, 1998, Vol. 26, 2150-2155. Debido a la sensibilidad de esta técnica, se minimiza la aparición de resultados falsos negativos y puede valorarse un resultado de "expresión negativa de L1" con una mayor confianza.

La invención proporciona un método de cribado de sujetos humanos para determinar la presencia de VPH integrado o de un genoma de VPH episómico modificado que puede basarse en el cribado para determinar la expresión de ARNm de E6 solo. Por tanto, la invención se refiere a un método *in vitro* de cribado de sujetos humanos para determinar la presencia de VPH integrado o un genoma de VPH episómico modificado, método que comprende la selección del sujeto por la expresión de transcritos de ARNm del gen E6 del virus del papiloma humano, en el que los sujetos positivos para la expresión de ARNm de E6 se clasifican como portadores de VPH integrado o de un genoma de VPH episómico modificado.

Además, los individuos se clasifican como pertenecientes a una de dos categorías de riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino sobre la base de una determinación "sí/no" de la expresión del ARNm de E6 solo. Por tanto, la invención proporciona un método *in vitro* de cribado de sujetos humanos con el fin de determinar su riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino, método que comprende la selección del sujeto por la expresión de transcritos de ARNm del gen E6 de VPH, y la clasificación del sujeto en una de dos categorías de riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino sobre la base de la expresión del ARNm de E6, en el cual los individuos positivos para la expresión de ARNm de E6 se clasifican como portadores de VPH integrado o de un genoma de VPH episómico modificado y, por tanto, se clasifican como de "alto riesgo" de desarrollar carcinoma de cuello uterino, mientras que los individuos negativos para la expresión de ARNm de E6 se califican como no portadores de VPH integrado o de un genoma de VPH episómico modificado y son por tanto clasificados como "sin riesgo detectable" de desarrollar carcinoma de cuello uterino.

Los sujetos se clasifican en una de dos categorías de riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino sobre la base de una determinación "sí/no" de la expresión de ARNm de E6 en células del cuello uterino. Los individuos positivos para la expresión de ARNm de E6 se clasifican como portadores de VPH integrado o de un genoma de VPH episómico modificado y, por tanto, se clasifican como de "alto riesgo" de desarrollar carcinoma de cuello uterino, mientras que los individuos negativos para la expresión de ARNm de E6 se califican como no portadores de VPH integrado ni de un genoma de VPH episómico modificado y, por tanto, se clasifican como "sin riesgo detectable" de desarrollar carcinoma de cuello uterino.

En el contexto del cribado de cuello uterino, la clasificación de los sujetos en los dos grupos con "alto riesgo" o "sin riesgo detectable" de desarrollar carcinoma de cuello uterino proporciona una base para tomar decisiones concernientes al tratamiento y/o a un cribado posterior. Por ejemplo, los sujetos en la categoría de alto riesgo pueden clasificarse como requeridores de un análisis adicional inmediato, por ejemplo, mediante colposcopia histológica, mientras que los que están en la categoría de riesgo no detectable pueden remitirse de nuevo al programa de cribado a intervalos de tres o cinco años. Estos métodos son particularmente útiles para determinar el riesgo de desarrollar carcinoma en sujetos que se sabe que están infectados con VPH, por ejemplo, los que dan positivo para ADN de VPH, o en sujetos que han manifestado previamente una anomalía de cuello uterino por citología o frotis Pap. Los sujetos colocados en la categoría de "sin riesgo detectable" sobre la base de la expresión de ARNm de E6, pueden tener presente ADN de VPH, pero el resultado negativo de la expresión de E6 indica que el VPH no está relacionado con actividad oncogénica en el momento del análisis.

La presencia de VPH integrado o un genoma de VPH episómico modificado, según indica un resultado positivo para la expresión de ARNm de E6, es en sí misma indicativa de que el sujeto tiene cambios celulares anormales en el cuello uterino. Por tanto, en el presente documento se describe un método que es un método *in vitro* para identificar sujetos humanos que tengan cambios celulares anormales en el cuello uterino, método que comprende la selección del sujeto por la expresión de transcritos de ARNm del gen E6 de un VPH de los enumerados anteriormente, en el

que los individuos positivos para la expresión de ARNm de E6 se identifican como portadores de cambios celulares anormales en el cuello uterino.

La expresión "cambios celulares anormales en el cuello uterino", incluye cambios celulares que son característicos de una enfermedad más grave que las lesiones de cuello uterino de grado bajo o que las lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo; incluye cambios celulares que son característicos de enfermedades de igual o mayor gravedad que la CIN de alto grado (definida como una expansión neoplásica de células transformadas), CIN (neoplasia intraepitelial de cuello uterino, por sus siglas en inglés) III o neoplasia intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL, por sus siglas en inglés), incluyendo lesiones con un perfil de ADN multiploide y lesiones CIN "malignas" con valores incrementados del índice medio de ADN, un elevado porcentaje de aneuploidia de ADN y tasas que exceden 2,5c (Hanselaar y col., 1992, *Anal. Cell. Pathol.*, 4: 315-324; Rihet y col., 1996, *J. Clin. Pathol.*, 49: 892-896; y McDermott y col., 1997, *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 104: 623-625).

La Neoplasia Intraepitelial de cuello uterino (abreviada "CIN" por sus siglas en inglés), denominada también Displasia de cuello uterino, es una afección del de cuello uterino causada por el Virus del Papiloma Humano. La CIN es clasificada como I, II o III dependiendo de su gravedad. Se considera una anomalía precancerosa, pero no un cáncer real. La forma más leve, CIN I, remite normalmente por sí misma, aunque raramente puede progresar a cáncer. Las formas más graves, CIN II y CIN III, muy a menudo permanecen igual o empeoran con el tiempo. Pueden convertirse en cáncer, pero casi nunca lo hacen si se tratan adecuadamente.

Se ha identificado al VPH como un agente causante del desarrollo de cambios celulares en el cuello uterino, que pueden dar lugar al desarrollo de cáncer de cuello uterino. Estos cambios celulares se asocian a la expresión constitutiva o persistente de las proteínas E6/E7 del genoma vírico de VPH. Por tanto, es posible concluir que aquellos sujetos en los que puede detectarse la expresión de ARNm de E6, particularmente aquellos sujetos que presentan una expresión de E6 persistente cuando se determina a lo largo de un periodo de tiempo, manifiestan ya cambios celulares en el cuello uterino. Estos cambios celulares pueden tener lugar solamente en unas pocas células del cuello uterino y pueden no ser detectables mediante citología convencional. No obstante, con la utilización de métodos sensibles, específicos y precisos para la detección de ARNm de E6, es posible identificar a aquellos sujetos que presentan ya cambios celulares en el cuello uterino en un estado mucho más temprano del que sería posible utilizando el cribado citológico convencional. Esto permitirá una intervención más temprana con tratamientos encaminados a prevenir el desarrollo de carcinoma de cuello uterino.

Como resultado de la integración de VPH en el genoma o como resultado de la "modificación" en un genoma de VPH episómico modificado, se pierde el control normal de la transcripción de los oncogenes E6/E7 víricos (Durst y col., 1985, *J. Gen. Virol.*, 66 (Pt 7): 1515-1522; Pater y Pater, 1985, *Virology*, 145: 313-318; Schwarz y col., 1985, *Nature*, 314: 111-114; Park y col., 1997, ídem). Por el contrario, en lesiones premalignas y en epitelio normal infectado con VPH, los virus del papiloma predominan en formas episómicas "sin modificar" y por tanto la transcripción del oncogén puede estar ausente o estar regulada negativamente eficazmente (Johnson y col., 1990, *J. Gen. Virol.*, 71 (Pt 7): 1473-1479; Falcinelli y col., 1993, *J. Med. Virol.*, 40: 261-265). Se ha observado que la integración de ADN del virus del papiloma humano de tipo 16 en el genoma humano da lugar a una actividad celular/genoma más inestable, y a una estabilidad incrementada de los ARNm de E6 y E7 (Jeon y Lambert, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 1654-1658). Por tanto, la integración del VPH, encontrada normalmente en cánceres de cuello uterino pero encontrada solamente de manera poco frecuente en lesiones CIN (Carmody y col., 1996, *Mol. Cell. Probes*, 10: 107-116), parece ser un acontecimiento importante en la carcinogénesis de cuello uterino.

El presente método detecta la expresión de ARNm vírico de E6/E7 en el cuello uterino en lugar de ADN. La expresión vírica de E6/E7 en células de cuello uterino es una determinación del riesgo de desarrollar cáncer mucho más precisa que demostrar simplemente que el virus VPH está presente. Además, la detección de transcritos de oncogenes del VPH puede ser un indicador más sensible de la implicación directa de oncogenes víricos en la carcinogénesis (Rose y col., 1994, *Gynecol. Oncol.*, 52: 212-217; Rose y col., 1995, *Gynecol. Oncol.*, 56: 239-244). La detección de transcritos de E6/E7 por amplificación y detección es una herramienta de diagnóstico útil para las evaluaciones del riesgo relacionado con el desarrollo de CIN y su progresión a cáncer de cuello uterino, especialmente en las pacientes infectadas por tipos de VPH de alto riesgo con ASCUS y CIN I (Sotlar y col., 1998, *Gynecol. Oncol.*, 69: 114-121; Selinka y col., 1998, *Lab. Invest.*, 78: 9-18).

La expresión de transcritos de E6/E7 de VPH 16/18 está correlacionada uniformemente con el estatus físico de los ADNs del VPH (Park y col., 1997, *Gynecol. Oncol.*, Vol. 65(1), 121-9). En la mayoría de las células de carcinoma de cuello uterino, los genes E6 y E7 de virus del papiloma humano específicos son transcritos a partir de secuencias víricas integradas en los cromosomas de las células hospedadoras (von Kleben Doeberitz y col., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 88(4), 1411-5). La carga y la integración víricas se han evaluado en una serie grande de lesiones CIN (Pietsaro y col., 2002, *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 40(3), 886-91). Solamente una muestra contenía exclusivamente ADN de VPH 16 episómico, y esta lesión experimentó un retroceso espontáneamente. Se identificaron previamente 17 de 37 muestras de carcinoma de cuello uterino invasivo como contenedoras del genoma de VPH 16 completamente integrado mediante la utilización de una PCR que cubría el gen E1/E2 completo, y esto se confirmó mediante rPCR en 16 casos. Un caso, sin embargo, mostró un bajo nivel de ácido desoxirribonucleico episómico además de la forma integrada predominante. De las 20 muestras de carcinoma

restantes que presentaban formas episómicas en los análisis previos, se encontraron 14 que contenían formas integradas utilizando rliPCR, y 4 contenían formas episómicas multiméricas (modificadas). Por tanto, en total, 31 de 37 de los carcinomas (84 %) presentaban el genoma de VPH 16 integrado, mientras que no pudo detectarse la ausencia de integración (Kalantari y col., 2001, *Diagn. Mol. Pathol.*, Vol. 10(1), 46-54).

No ha habido virtualmente ninguna observación de que existan células de carcinoma de cuello uterino sin ADN de VPH integrado o sin ADN de VPH episómico modificado (Kalantari y col., 2001; Pietsaro y col., 2002, *ídem*). Se ha demostrado además que E6 y E7 pueden ser transcritos únicamente a partir de ADN de VPH integrado o episómico modificado (von Kleben Doeberitz y col., 1991, *ídem*). Por tanto, los inventores suponen que la detección de la expresión de E6/E7 proporciona una indicación directa de VPH integrado o VPH episómico modificado y de una elevada actividad oncogénica, y concluyen que en un contexto clínico la detección de la expresión de E6 (E6/E7) sola es suficiente para identificar sujetos con "riesgo elevado" de desarrollar carcinoma de cuello uterino. En otras palabras, si puede detectarse la expresión de ARNm de E6/E7 en una muestra de cuello uterino, esto es indicativo directamente de anomalías celulares en el cuello uterino y existe un riesgo muy elevado de desarrollar carcinoma de cuello uterino debido a la actividad persistente de los oncogenes del VPH. Por tanto, la detección de ARNm de E6/E7 en un sujeto humano indica que el sujeto tiene un riesgo muy elevado de desarrollar carcinoma de cuello uterino y debería ser sometido a un cribado adicional inmediato, por ejemplo, mediante colposcopia.

Si no se detecta la expresión de ARNm de E6/E7 de VPH, el sujeto puede aún tener una infección por VPH. Sin embargo, debido a la ausencia de integración y de actividad oncogénica, puede remitir espontáneamente (según ha sido observado por Pietsaro y col., 2002, *ídem*).

En un contexto clínico, la realización de métodos que se basan en el cribado para determinar la expresión de ARNm de E6 solo, depende de manera crítica de la capacidad para calificar con confianza un resultado negativo para la expresión de ARNm de E6. Esto requiere de nuevo una técnica de detección que tenga una sensibilidad máxima, a la vez que produzca resultados falsos negativos mínimos. En una realización preferida, esto se consigue mediante la utilización de una técnica de amplificación y detección en tiempo real sensible para seleccionar por la presencia o ausencia de ARNm de E6. La técnica más preferida es la amplificación mediante NASBA en tiempo real utilizando sondas moleculares fluorescentes, según se describe por Leone y col., *Nucleic Acids Research*, 1998, Vol. 26, 2150-2155. Debido a la sensibilidad de esta técnica, la aparición de resultados falsos negativos se minimiza y un resultado de "expresión negativa de E6" puede calificarse con mayor confianza. Esto es extremadamente importante si los ensayos van a utilizarse en el contexto de un programa de cribado clínico.

En los métodos basados en la detección de ARNm de E6 solo, es preferible detectar al menos los tipos de VPH 16, 18, 31, 33 y 45, y en una realización preferida el ensayo puede detectar solamente estos tipos de VPH. Se ha detectado ADN de los tipos de VPH 16, 18, 31 y 33 en más de un 87 % de muestras de carcinoma de cuello uterino (Karlsen y col., 1996, *J. Clin. Microbiol.*, 34: 2095-2100). Otros estudios han demostrado que E6 y E7 se conservan casi invariablemente en los cánceres de cuello uterino, ya que es probable que su expresión sea necesaria para la conversión en, y el mantenimiento de, el estado maligno (Choo y col., 1987, *J. Med. Virol.*, 21: 101-107; Durst y col., 1995, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 85: 105-112). En contraste con los sistemas de detección de VPH que están basados en la detección del genoma no dañado o de la secuencia del gen L1, la detección del ARNm de VPH expresado a partir del área E6/E7 puede detectar más de un 90 % de las pacientes relacionadas directamente con un riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino.

En la clínica, se prefieren los métodos basados en la detección del ARNm de E6 para su uso en el post-cribado, esto es en un análisis posterior de individuos que tengan un diagnóstico previo de ASCUS, CIN I o condiloma. El método puede utilizarse para seleccionar a aquellos sujetos con un riesgo elevado de desarrollar carcinoma de cuello uterino de entre el grupo de individuos con un diagnóstico previo de ASCUS, CIN I o condiloma. ASCUS, condiloma y CIN I pueden definirse como más o menos el mismo diagnóstico, debido a una reproducibilidad muy baja entre diferentes citólogos y diferentes departamentos de citología. Östör (*Int. J. Gyn. Pathol.*, 12: 186-192, 1993) encontró que solamente alrededor del 1 % de los casos de CIN I puede progresar a carcinoma de cuello uterino. Por tanto, existe la necesidad genuina de un método eficaz para identificar el subgrupo de individuos con ASCUS, condiloma o CIN I con un riesgo sustancial de desarrollar carcinoma de cuello uterino. Uno de los tipos de VPH 16, 18, 31 o 33 se detectó en el 87 % de los casos de carcinoma de cuello uterino estudiados por Karlsen y col., 1996. Mediante la inclusión del VPH 45, se descubrió que casi el 90 % de las muestras de carcinoma de cuello uterino están relacionadas con estos cinco tipos de VPH. Por tanto, calculado a partir de los datos proporcionados por Östör (*Int. J. Gyn. Pathol.*, 12: 186-192, 1993) más de un 99,9 % son casos detectados con ASCUS, CIN I o condiloma pasados por alto por nuestro kit VPH-Proof.

En los métodos de la invención, se considera que la "expresión positiva" de un ARNm indica una expresión por encima del fondo. No existe un requisito absoluto de determinación cuantitativa precisa del nivel de expresión de ARNm o de una determinación precisa de los niveles relativos de expresión del ARNm de L1 y E6.

En ciertas realizaciones, los métodos de la invención pueden comprender una determinación cuantitativa de los niveles de expresión de ARNm. En una realización preferida, con el fin de proporcionar una distinción clara entre "expresión positiva" y "expresión negativa", una determinación de la "expresión positiva" puede requerir la presencia

de más de 50 copias del ARNm relevante (por ml de muestra o por volumen total de muestra), mientras que una determinación de la "expresión negativa" puede requerir la presencia de menos de 1 copia del ARNm relevante (por ml de muestra o por volumen total de muestra).

5 Los métodos de la invención preferentemente implicarán la selección por ARNm de E6 utilizando una técnica que sea capaz de detectar específicamente ARNm de E6 de tipos de VPH asociados al cáncer, más preferentemente de tipos de VPH asociados al cáncer de "alto riesgo". En la realización más preferida los métodos implican la selección por ARNm de E6 utilizando una técnica que sea capaz de detectar ARNm de E6 de los tipos de VPH 16, 18, 31 y 33, y preferentemente también 45. Más preferentemente, el método detectará específicamente la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, y preferentemente también el 45, y mucho más preferentemente los cinco tipos. Sin embargo, las mujeres positivas para la expresión de E6 de otros tipos distintos de 16, 18, 31, 33 y 45, por ejemplo, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 pueden tener aún "riesgo" de desarrollar carcinoma de cuello uterino. Por tanto, el método puede abarcar la selección de la expresión de ARNm de E6 de uno o más de estos tipos de VPH, muy preferentemente además de la selección por ARNm de E6 de los tipos de VPH 16, 18, 31, 33 y 45. Ciertos tipos de VPH presentan una notable distribución geográfica/poblacional. Por tanto, puede ser apropiado incluir cebadores específicos para un tipo de VPH conocido como prevalente en el área poblacional/geográfica sometida a ensayo, por ejemplo, además de la selección de los tipos de VPH 16, 18, 31, 33 y 45.

20 Para evitar dudas, a menos que se indique de otro modo, la expresión "ARNm de E6", según se utiliza en el presente documento, incluye todos los transcritos de ARNm existentes de manera natural que contienen todo o parte del marco de lectura abierto de E6, incluyendo las variantes por corte y empalme que tienen lugar de forma natural, e incluye por tanto transcritos que contienen adicionalmente todo o parte del marco de lectura abierto de E7 (y además marcos de lectura abiertos adicionales). Las expresiones "ARNm de E6/E7", "transcritos de E6/E7", etc., se utilizan indistintamente con las expresiones "ARNm de E6", "transcritos de E6" e incluyen también los transcritos de ARNm existentes de manera natural que contienen todo o parte del marco de lectura abierto de E6, incluyendo las variantes por corte y empalme existentes de forma natural, y transcritos que contienen todo o parte del marco de lectura abierto de E7. La expresión "expresión de oncogenes", a menos que se indique de otro modo, se refiere también a transcritos de ARNm existentes de forma natural que contienen todo o parte del marco de lectura abierto de E6, incluyendo variantes de corte y empalme que tienen lugar de forma natural, y transcritos que contienen todo o parte del marco de lectura abierto de E7.

35 Se han descrito hasta ahora cuatro especies de ARNm de E6/E7 en células infectadas con VPH 16, a saber, un transcrito de E6 no cortado y empalmado y tres transcritos cortados y empalmados denominados E6\*I, E6\*II y E6\*III (Smotkin, D. y col., *J. Virol.*, Marzo 1989, 63(3): 1441-7; Smotkin, D., Wettstein, F.O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Julio 1986, 83(13): 4680-4; Doorbar, J. y col., *Virology*, Septiembre 1990, 178(1): 254-62; Cornelissen, M.T. y col., *J. Gen. Virology*, Mayo 1990, 71 (Pt 5): 1243-6; Johnson, M.A. y col., *J. Gen. Virol.*, Julio 1990, 71 (Pt 7): 1473-9; Schneider-Maunoury, S. y col., *J. Virol.*, Octubre 1987, 61(10): 3295-8; Sherman, L. y col., *Int. J. Cancer*, Febrero 1992, 50(3): 356-64). Los cuatro transcritos se transcriben a partir de un único promotor (p97) situado justo corriente arriba del segundo ATG del ORF de E6.

45 En una realización, los métodos pueden comprender la selección por transcritos de E6 que contienen todo o parte del marco de lectura abierto de E7. Esto puede realizarse, por ejemplo, utilizando cebadores o sondas específicos para la región codificadora de E7.

50 En una realización adicional, los métodos pueden comprender la selección por la presencia de transcritos de E6 de "longitud completa". En el caso de VPH 16, la expresión "transcritos de E6 de longitud completa" se refiere a transcritos que contienen toda la región desde el nucleótido (nt) 97 al nt 880 del ORF de E6, los nt 97 y 880 inclusive. Las posiciones de los nucleótidos están numeradas de acuerdo con la nomenclatura convencional del VPH (véase *Human Papillomavirus Compendium OnLine*, disponible en internet o en forma impresa en la base de datos de HV, Mail Stop K710, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM 87545, EE.UU.). La detección específica de transcritos de longitud completa puede realizarse, por ejemplo, utilizando cebadores o sondas que sean específicos para la región que está presente únicamente en los transcritos de E6 de longitud completa, y no en las variantes por corte y empalme. Tipos diferentes de VPH presentan patrones diferentes de expresión del ARNm de E6/E7. Los mapas de transcritos para varios tipos de VPH, incluyendo los tipos de VPH 16 y 31, que pueden utilizarse para facilitar el diseño de sondas o cebadores para la detección de transcritos de E6/E7, están disponibles públicamente a través del *Human Papillomavirus Compendium* (igual que anteriormente).

60 En el presente documento se describen cebadores oligonucleotídicos de E6 que son adecuados para su uso en la amplificación de regiones del ARNm de E6 de varios tipos de VPH mediante NASBA o PCR.

65 Los métodos que implican la selección por la expresión de ARNm de L1 pueden comprender la selección por la expresión del ARNm de L1 utilizando una técnica que sea capaz de detectar ARNm de L1 de sustancialmente todos los tipos conocidos de VPH o de al menos los tipos de VPH asociados al cáncer principales (por ejemplo, preferentemente todos los tipos de VPH 16, 18, 31 y 33). En el presente documento se describen cebadores y sondas de L1 que son capaces de detectar ARNm de L1 de los tipos de VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 y 51 en

muestras de cuello uterino.

Puede decirse que la detección de los transcritos de L1 detecta la "virulencia" del VPH, significando la presencia de actividad lítica del VPH. Puede decirse que la detección de los transcritos de E6/E7 detecta la "patogenia" del VPH, ya que la expresión de estos ARNm es indicativa de acontecimientos moleculares asociados al riesgo de desarrollar carcinoma.

En un estudio con 4589 mujeres fue posible detectar todos los casos excepto uno de lesiones CIN III o cáncer utilizando un método basado en el cribado para determinar la expresión de ARNm de E6 y L1 (véase los Ejemplos acompañantes).

Los métodos anteriormente descritos pueden comprender el cribado para determinar la expresión de transcritos de ARNm del gen p16<sup>ink4a</sup> humano, además del cribado para determinar la expresión de transcritos de L1 y/o E6 de VPH.

Un resultado positivo para la expresión del ARNm de p16<sup>ink4a</sup> se considera una indicación adicional de riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino.

El p16<sup>ink4a</sup>, y los miembros de la familia relacionados, puede funcionar regulando la fosforilación y la actividad supresora del crecimiento del producto del gen del retinoblastoma (RB). Como apoyo de esto, se ha encontrado que existe una relación inversa entre la expresión de la proteína p16<sup>ink4a</sup> y la presencia de RB normal en estirpes de células cancerosas seleccionadas; la proteína p16<sup>ink4a</sup> es detectable cuando RB es mutante, se ha eliminado o inactivado, y está notablemente reducida o ausente en estirpes celulares que contienen un RB normal. Kheif y col. (Kheif, S.N. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 4350-4354, 1996), encontraron que la proteína p16<sup>ink4a</sup> se expresa en células de carcinoma de cuello uterino humano que contienen un RB mutante o un RB de tipo salvaje que está inactivado funcionalmente por E7. Demostraron también que la inactivación de RB se correlaciona con una regulación por incremento de p16<sup>ink4a</sup>, confirmando un bucle de retroalimentación que implica a p16<sup>ink4a</sup> y RB. Milde-Langosch y col. (Milde-Langosch, K. y col. (2001) *Virchows Arch.*, 439: 55-61) encontraron que existían correlaciones significativas entre una potente expresión de p16 y la infección por VPH 16/18 y entre una potente expresión de p16 y la expresión de los oncogenes E6/E7 de VPH 16/18. Klaes y col. (Klaes, R. y col. (2001) *Int. J. Cancer*, 92: 276-284) observaron una potente sobreexpresión del producto del gen p16<sup>ink4a</sup> en 150 de 152 lesiones de cuello uterino displásicas de grado alto (CIN II a cáncer invasivo), mientras que epitelio de cuello uterino normal o lesiones inflamatorias o metaplásicas no se teñían con el anticuerpo monoclonal E6H4 específico para p16<sup>ink4a</sup>. Todas las lesiones clasificadas como CIN I asociadas a los tipos LR-VPH no presentaban ninguna reactividad o únicamente una reactividad focal o esporádica, mientras que todas las lesiones clasificadas como CIN I, excepto dos de las mismas, asociadas a los tipos HR-VPH presentaban una tinción potente y difusa para p16<sup>ink4a</sup>.

Los métodos de selección descritos pueden realizarse en una preparación de ácido nucleico aislado de una muestra clínica o de una biopsia conteniendo células de cuello uterino tomadas del sujeto sometido ensayo. Las muestras adecuadas que pueden utilizarse como fuente de ácido nucleico incluyen (pero no exclusivamente) muestras de cuello uterino recogidas con una torunda, biopsias de cuello uterino, raspados de cuello uterino, biopsias/verrugas cutáneas, también tejidos incluidos en parafina y células fijadas con formol o metanol.

La preparación de ácido nucleico que se ha de cribar utilizando el método descrito debe incluir ARNm, sin embargo no es necesario que sea una preparación de ARNm poli A+ purificado, y preparaciones de ARN total o preparaciones en bruto de ácido nucleico total que contenga ARN y ADN genómico, o incluso lisados celulares en bruto, son también adecuados como material de partida para una reacción de NASBA. Esencialmente, cualquier técnica conocida en la técnica para el aislamiento de una preparación de ácido nucleico que incluya ARNm puede utilizarse para aislar ácido nucleico de una muestra de ensayo. Una técnica preferida es el método de aislamiento de "Boom" descrito en el documento US-A-5.234.809 y el documento EP-B-0389.063. Este método, que puede utilizarse para aislar una preparación de ácido nucleico que contenga ARN y ADN, se basa en las propiedades de las partículas de dióxido de silicio para unirse a ácidos nucleicos en presencia del agente caotrópico tiocianato de guanidina (GuSCN).

Los métodos de la invención se basan en la determinación de transcripción activa del genoma del VPH en células de cuello uterino. Los métodos no están limitados con respecto a la técnica precisa utilizada para detectar la expresión del ARNm. Se conocen en la técnica muchas técnicas para la detección de secuencias específicas de ARNm y pueden utilizarse de acuerdo con la invención. Por ejemplo, pueden detectarse ARNm específicos mediante técnicas de hibridación, amplificación o secuenciación.

Se prefiere más detectar la expresión del ARNm por medio de una técnica de amplificación, muy preferentemente una amplificación isotérmica tal como NASBA, la amplificación mediada por transcripción, la amplificación mediada por una señal de la tecnología del ARN, la amplificación en fase de solución isotérmica, etc. Todos estos métodos son bien conocidos en la técnica. Más preferentemente la expresión de ARNm se detecta mediante una amplificación isotérmica en combinación con la detección del producto de amplificación en tiempo real. La combinación más preferida es la amplificación mediante NASBA, acoplada con la detección en tiempo real del

producto de amplificación utilizando la tecnología de sondas moleculares fluorescentes ("balizas"), según se describe por Leone y col., *Nucleic Acids Research*, 1998, Vol. 26, 2150-2155.

Los métodos para la detección de VPH en una muestra de ensayo utilizando la técnica NASBA comprenderán generalmente las etapas siguientes:

(a) la preparación de un medio de reacción conteniendo pares de cebadores adecuados, una ADN polimerasa dirigida por ARN, una ribonucleasa que hidrolice la hebra de ARN de un híbrido ARN-ADN sin hidrolizar el ARN o ADN monocatenario o bicatenario, una ARN polimerasa que reconozca dicho promotor y trifosfatos de ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos;

(b) la incubación del medio de reacción con una preparación de ácido nucleico aislado de una muestra de ensayo sospechosa de contener VPH, en condiciones de reacción que permitan una reacción de amplificación mediante NASBA; y

(c) la detección y/o la medida cuantitativa de cualquier producto específico del VPH de la reacción de amplificación por NASBA.

La detección del producto o los productos específicos de la reacción del NASBA (esto es copias codificantes y/o no codificantes del ARN diana) puede realizarse de varias maneras diferentes. En un enfoque, el producto o los productos del NASBA pueden detectarse con la utilización de una sonda de hibridación específica del VPH capaz de hibridarse específicamente con el producto del NASBA. La sonda de hibridación puede estar ligada a un marcador revelador, por ejemplo, un compuesto fluorescente, luminiscente, radiactivo o quimioluminiscente o a un marcador enzimático o a cualquier otro tipo de marcador conocido por los expertos habituales en la materia. La naturaleza exacta del marcador no es crítica, pero debe ser capaz de producir una señal detectable por un medio externo, ya sea por sí misma o junto con una o más sustancias adicionales (por ejemplo, el sustrato de un enzima).

Un método de detección preferido es el denominado "NASBA en tiempo real" que permite el control continuo de la formación del producto de la reacción del NASBA a lo largo del curso de la reacción. En una realización preferida, esto puede conseguirse utilizando una sonda "molecular fluorescente" ("baliza") que contenga una secuencia específica del VPH capaz de hibridarse con el producto del NASBA, una secuencia oligonucleotídica que forme un dúplex troncal y un par de restos fluorescentes/inactivadores, según se conoce en la técnica y se describe en el presente documento. Si la sonda fluorescente molecular se añade a la mezcla de reacción antes de la amplificación, puede ser posible controlar la formación del producto del NASBA en tiempo real (Leone y col., *Nucleic Acids Research*, 1998, Vol. 26, 2150-2155). Hay kits de reactivos e instrumentación disponibles en el mercado para llevar a cabo la detección mediante NASBA en tiempo real (por ejemplo, NucliSens™ EasyQ System, de Organon Teknika).

En un enfoque adicional, la tecnología de sondas fluorescentes moleculares ("balizas") puede incorporarse al oligonucleótido cebador 2, permitiendo el control en tiempo real de la reacción del NASBA sin la necesidad de una sonda de hibridación separada.

En un enfoque adicional más, los productos de la reacción del NASBA pueden controlarse utilizando una sonda de detección genérica marcada que se hibride con una secuencia de nucleótidos del extremo 5' del oligonucleótido cebador 2. Esto es equivalente al sistema de detección "NucliSens™" suministrado por Organon Teknika. En este sistema, la especificidad para los productos del NASBA derivados del ARNm del VPH diana puede ser conferida por la utilización de sondas de captura específicas para el VPH que contengan oligonucleótidos sonda, según se describe en el presente documento, unidos a un soporte sólido tal como una microesfera magnética. Muy preferentemente, la sonda de detección genérica marcada es la sonda de detección ECL™ suministrada por Organon Teknika. Los amplicones del NASBA se hibridan con las sondas de captura específicas para el VPH y a la sonda ECL genérica (a través de una secuencia complementaria en el cebador 2). Después de la hibridación, los complejos esfera/amplicón/sonda ECL pueden capturarse en el electrodo magnético de un lector de ECL automático (por ejemplo, el lector NucliSens™ suministrado por Organon Teknika). Posteriormente, un pulso de voltaje desencadena la reacción de ECL™.

La detección de ARNm del VPH tiene también relevancia clínica en cánceres distintos del carcinoma de cuello uterino incluyendo, por ejemplo, el carcinoma de cabeza y cuello, el carcinoma oral y de lengua, el carcinoma cutáneo y el carcinoma anal y vaginal. La detección del ARNm de VPH puede ser también muy útil en el diagnóstico de micrometástasis en los nódulos linfáticos de la parte inferior del organismo. Por tanto, los métodos descritos también contemplan cribados para determinar la susceptibilidad a los cánceres enumerados anteriormente basados en el cribado para determinar la expresión de transcritos VPH L1 y E6.

En el presente documento se describe un kit para su uso en la detección de transcritos de los genes L1 y E6 del VPH, comprendiendo el kit al menos un par de cebadores adecuados para su uso en la amplificación de una región de los transcritos de L1 de al menos los tipos de VPH 16, 18, 31 y 33, y preferentemente también del VPH 45, y uno o más pares de cebadores que permitan la amplificación de una región de los transcritos de E6 de los tipos de VPH 16, 18, 31 y 33, y preferentemente también de VPH 45.

Un "par de cebadores" significa un par de cebadores que pueden utilizarse en combinación para amplificar una región específica del ARNm de L1 o E6 utilizando cualquier técnica conocida de amplificación de ácidos nucleicos. Los pares de cebadores incluidos en el kit serán adecuados para su utilización en la técnica de amplificación mediante NASBA o en técnicas de amplificación isotérmicas similares.

5 Los cebadores individuales que constituyen cada par de cebadores incluido en el kit pueden suministrarse por separado (por ejemplo, un recipiente separado para cada cebador) o, más preferentemente, pueden suministrarse mezclados en un único recipiente. Pueden suministrarse combinaciones de dos o más pares de cebadores ya mezcladas en un único recipiente del kit. Puede ser conveniente suministrar dos o más pares de cebadores en un  
10 único recipiente cuando las dos o más reacciones de amplificación van a ser "multiplexadas", lo que significa realizadas simultáneamente en un único recipiente de reacción.

15 El o los pares de cebadores adecuados para su uso en la amplificación de una región de transcritos de E6 deberían facilitar la amplificación de una región del ARNm de E6 de al menos los principales tipos de VPH asociados a cáncer 16, 18, 31 y 33, y preferentemente también de VPH 45. Existen varias formas diferentes mediante las cuales puede conseguirse esto.

20 El kit puede contener pares de cebadores separados específicos para cada uno de los tipos de VPH 16, 18, 31 y 33, y preferentemente también VPH 45. Estos pares de cebadores pueden suministrarse en el kit en recipientes separados, o pueden suministrarse como mezclas de dos o más pares de cebadores en un único recipiente, por ejemplo, para permitir la "simultaneidad" de las reacciones de amplificación.

25 El kit puede contener un solo par de cebadores capaces de amplificar una región del gen E6 de los tipos de VPH 16, 18, 31 y 33, y preferentemente también VPH 45, que permita de este modo la amplificación de los cuatro (preferentemente los cinco) tipos en una sola reacción de amplificación. Esto podría conseguirse, por ejemplo, con la utilización de un par de cebadores degenerados o por la selección de una región del ARNm de E6 que esté muy conservada entre los tipos de VPH.

30 El par de cebadores para E6 puede corresponder a cualquier región del ARNm de E6, y puede permitir la amplificación de todo o de parte del marco de lectura abierto de E6 y/o del marco de lectura abierto de E7.

35 El kit puede incluir adicionalmente pares de cebadores adecuados para su uso en la amplificación de ARNm de E6 de tipos de VPH distintos de los tipos 16, 18, 31 y 33, y preferentemente también VPH 45. Por ejemplo, el kit puede complementarse con cebadores E6 para la detección de un tipo de VPH que es endémico en un área geográfico o población particular.

40 El o los pares de cebadores adecuados para su uso en la amplificación de una región de los transcritos de L1 deberían ser capaces de amplificar una región del ARNm de L1 de al menos los tipos de VPH asociados a cáncer principales 16, 18, 31 y 33, y preferible también de VPH 45, y preferentemente serán adecuados para su uso en la amplificación de una región de los ARNm de L1 de sustancialmente todos los tipos conocidos de VPH. Con la utilización de dichos cebadores es posible analizar la transcripción activa del ARNm de L1 de múltiples tipos de VPH en una única reacción de amplificación.

45 Es posible diseñar cebadores capaces de detectar transcritos de L1 de múltiples tipos de VPH mediante la selección de regiones del transcrito de L1 que estén muy conservadas.

50 En un enfoque adicional, puede conseguirse la especificidad para múltiples tipos de VPH mediante la utilización de cebadores oligonucleotídicos degenerados o de mezclas complejas de polinucleótidos que presenten pequeñas variaciones de la secuencia, correspondientes preferentemente a sitios de variación de la secuencia entre genotipos de VPH. La razón fundamental para la utilización de dichos cebadores degenerados o mezclas es que la mezcla puede contener al menos un par de cebadores capaz de detectar cada tipo de VPH.

55 En un enfoque adicional más, la especificidad para múltiples tipos de VPH puede conseguirse mediante la incorporación en los cebadores de uno o más nucleótidos de inosina, preferentemente en los lugares de variación de las secuencias entre los genotipos de VPH.

60 Los pares de cebadores para E6 y L1 pueden suministrarse en recipientes separados dentro del kit, o el o los pares de cebadores para L1 pueden suministrarse como una mezcla con uno o más pares de cebadores para E6 en un único recipiente.

65 Los kits pueden contener además una o más sondas adecuadas para su uso en la detección de los productos de las reacciones de amplificación realizadas utilizando los pares de cebadores incluidos en el kit. La o las sondas pueden suministrarse como un reactivo separado en el kit. Alternativamente, la o las sondas pueden suministrarse como una mezcla con uno o más pares de cebadores.

Los cebadores y las sondas incluidos en el kit son preferentemente moléculas de ADN de cadena sencilla. Pueden utilizarse también polinucleótidos sintéticos no naturales que conserven la capacidad de apareamiento de bases con una molécula de ácido nucleico complementaria, incluyendo oligonucleótidos sintéticos que incorporen bases modificadas y oligonucleótidos sintéticos en los que los enlaces entre los nucleósidos individuales incluyan enlaces distintos de los enlaces fosfodiéster. Los cebadores y las sondas pueden producirse de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica, tal como mediante síntesis química utilizando aparatos y protocolos convencionales para la síntesis de oligonucleótidos.

Los cebadores y las sondas serán normalmente polinucleótidos monocatenarios aislados de no más de 100 bases de longitud, más normalmente de menos de 55 bases de longitud. Para evitar dudas, se manifiesta en el presente documento que los términos "cebador" y "sonda" excluyen genomas de VPH de longitud completa existentes de forma natural.

Pueden incluirse en el kit varios tipos generales de cebadores y sondas oligonucleotídicos que incorporen secuencias específicas del VPH. Normalmente, dichos cebadores y sondas pueden contener secuencias adicionales que no sean del VPH, por ejemplo, secuencias que se requieran para una reacción de amplificación o que faciliten la detección de los productos de la reacción de amplificación.

El primer tipo de cebadores son los oligonucleótidos cebadores 1 (denominados también en el presente documento cebadores P1 del NASBA), que son oligonucleótidos de generalmente 50 bases de longitud aproximadamente, que contienen una media de 20 bases aproximadamente en el extremo 3' y que son complementarios a una región del ARNm diana. Los oligonucleótidos adecuados para su uso como cebadores P1 del NASBA se denominan "P1/PCR" en la Tabla 1. Los oligonucleótidos cebadores P1 tienen la estructura general  $X_1$ -SEQ, en la cual SEQ representa una secuencia específica para VPH y  $X_1$  es una secuencia que contiene un promotor que es reconocido por una ARN polimerasa específica. Se prefiere la utilización en los oligonucleótidos de promotores de bacteriófagos, por ejemplo, los promotores de T7, T3 y SP6, ya que proporcionan las ventajas de un elevado nivel de transcripción que depende únicamente de la unión de la ARN polimerasa apropiada. La secuencia " $X_1$ " puede comprender la secuencia AATTCTAATACGACTCACTATAGGG o la secuencia AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGG. Estas secuencias contienen un promotor de T7, que incluye el sitio de inicio de la transcripción para la ARN polimerasa de T7. Las secuencias específicas para VPH en los cebadores denominados en la Tabla 1 como "P1/PCR" también pueden adaptarse para su uso en cebadores convencionales de PCR. Cuando estas secuencias se utilizan como la base de los cebadores P1 del NASBA, tienen la estructura general  $X_1$ -SEQ, según se ha definido anteriormente. La secuencia del promotor  $X_1$  es esencial en un cebador P1 del NASBA. Sin embargo, cuando se utilizan las mismas secuencias como la base de cebadores de PCR convencionales, no es necesario incluir  $X_1$ .

Un segundo tipo de cebadores son los oligonucleótidos cebadores 2 del NASBA (denominados también en el presente documento cebadores P2 del NASBA) que contienen generalmente una secuencia de 20 bases aproximadamente sustancialmente idéntica a una región del ARNm diana. Las secuencias oligonucleotídicas denominadas en la Tabla 1 "P2/PCR" son adecuadas para su uso en cebadores P2 del NASBA y en cebadores convencionales para PCR.

Los oligonucleótidos destinados para su uso como cebadores P2 del NASBA pueden contener, además, una secuencia de nucleótidos en el extremo 5' que no esté relacionada con el ARNm diana pero que sea capaz de hibridarse con una sonda de detección genérica. La sonda de detección estará preferentemente marcada con, por ejemplo, un marcador fluorescente, luminiscente o enzimático. La sonda de detección puede marcarse con un marcador que permita la detección utilizando la tecnología ECL™, aunque se apreciará que la invención no se limita de ninguna manera a este método de detección particular. El extremo 5' de los oligonucleótidos cebadores 2 puede contener la secuencia GATGCAAGGTCGCATATGAG. Esta secuencia es capaz de hibridar con una sonda genérica ECL™ disponible en el mercado en Organon Teknika que tiene la estructura siguiente:



En un ejemplo diferente, el oligonucleótido cebador 2 puede incorporar la tecnología de "sondas moleculares fluorescentes" ("balizas"), que es conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en el documento WO 95/13399 por Tyagi y Kramer, *Nature Biotechnology*, 14: 303-308, 1996, para permitir el control en tiempo real de la reacción del NASBA.

También pueden incluirse en el kit oligonucleótidos sonda específicos de la diana. Los oligonucleótidos sonda contienen generalmente una secuencia de 20-25 bases aproximadamente sustancialmente idéntica a una región del ARNm diana, o al complemento de la misma. Ejemplos de secuencias oligonucleotídicas específicas para el VPH que son adecuadas para su uso como sondas se designan como "PO" en la Tabla 1. Los oligonucleótidos sonda pueden utilizarse como sondas de hibridación específicas de la diana para la detección de los productos de una reacción de NASBA o PCR. A este respecto, los oligonucleótidos sonda pueden acoplarse a un soporte sólido, tal como esferas paramagnéticas, para formar una sonda de captura (véase más adelante). El extremo 5' del oligonucleótido sonda puede estar marcado con biotina. La adición de una marca de biotina facilita la unión de la sonda a un soporte sólido a través de un enlace biotina/estreptavidina o biotina/avidina.

Las sondas específicas de la diana que permiten la detección en tiempo real de los productos de amplificación pueden incorporar la tecnología de las "sondas moleculares fluorescentes" ("balizas") que es conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, por Tyagi y Kramer, *Nature Biotechnology*, 14: 303-308, 1996 y en el documento WO 95/13399. Ejemplos de secuencias oligonucleotídicas específicas para el VPH adecuadas para su uso como sondas moleculares fluorescentes se denotan "MB" en la Tabla 1.

La expresión "sondas moleculares fluorescentes" ("balizas"), como se utiliza en el presente documento, quiere indicar moléculas que tienen la estructura:



en la que "diana" representa una secuencia de nucleótidos específica de la diana, "X<sub>2</sub>" y "X<sub>3</sub>" representan un resto fluorescente y un resto inactivador capaz de inactivar sustancialmente o completamente la fluorescencia procedente del resto fluorescente cuando los dos se mantienen juntos en una estrecha proximidad y "brazo<sub>1</sub>" y "brazo<sub>2</sub>" representan secuencias complementarias capaces de formar un dúplex troncal.

Las combinaciones preferidas de las secuencias "brazo<sub>1</sub>" y "brazo<sub>2</sub>" son como se indica a continuación, aunque éstas tienen la intención de ser ilustrativas más que limitantes de la invención:

cgcatg-SEQ-catgcg  
 ccagct-SEQ-agctgg  
 cacgc-SEQ-gcgtg  
 cgatcg-SEQ-cgatcg  
 ccgtcg-SEQ-cgacgg  
 cggacc-SEQ-ggtccg  
 ccgaagg-SEQ-ccttcgg  
 cacgtcg-SEQ-cgacgtg  
 cgcagc-SEQ-gctgcg  
 ccaagc-SEQ-gcttgg  
 ccaagcg-SEQ-cgcttgg  
 cccagc-SEQ-gctggg  
 ccaaagc-SEQ-gcttgg  
 cctgc-SEQ-gcagg  
 ccacc-SEQ-gggtgg  
 ccaagcc-SEQ-ggcttgg  
 ccagcg-SEQ-cgctgg  
 cgcatg-SEQ-catgcg

La utilización de la tecnología de sondas moleculares fluorescentes ("balizas") permite el control en tiempo real de las reacciones de amplificación, por ejemplo, la amplificación mediante NASBA (véase Leone y col., *Nucleic Acids Research*, 1998, Vol. 26, págs. 2150-2155). Las sondas moleculares fluorescentes ("balizas") incluyen generalmente secuencias complementarias que flanquean a la secuencia específica para el VPH, representadas en el presente documento por la notación brazo<sub>1</sub> y brazo<sub>2</sub>, que son capaces de hibridarse entre sí para formar una estructura de dúplex troncal. Las secuencias exactas del brazo<sub>1</sub> y el brazo<sub>2</sub> no son material de la invención, excepto por el requisito de que estas secuencias deben ser capaces de formar un dúplex troncal cuando la sonda no está unida a una secuencia del VPH diana.

Las sondas moleculares fluorescentes ("balizas") incluyen también un resto fluorescente y un resto inactivador, estando representados en el presente documento los restos fluorescente e inactivador por la notación X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub>. Como apreciará el lector experto, los restos fluorescente e inactivador se seleccionan de manera que el resto inactivador sea capaz de inactivar sustancialmente o completamente la fluorescencia procedente del resto fluorescente cuando los dos restos estén muy próximos, por ejemplo, cuando la sonda esté en la conformación "cerrada" de horquilla en ausencia de la secuencia diana. Después de la unión a la secuencia diana, los restos fluorescente e inactivador se mantienen separados, de manera que la fluorescencia procedente del resto fluorescente ya no resulta inactivada.

Muchos ejemplos de pares de restos inactivador/fluorescente adecuados que pueden utilizarse de acuerdo con la invención son conocidos en la técnica (véase el documento WO 95/13399, Tyagi y Kramer, *idem*). Puede utilizarse una amplia gama de fluoróforos de muchos colores diferentes, incluyendo por ejemplo, el ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), fluoresceína, FAM y Rojo Texas (véase Tyagi, Bratu y Kramer, 1998, *Nature Biotechnology*, 16, 49-53). La utilización de sondas marcadas con diferentes fluoróforos coloreados permite la detección "simultánea" de dos o más sondas diferentes en un único recipiente de reacción. Un inactivador preferido es el ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL), un cromóforo no fluorescente, que sirve como inactivador "universal" para una amplia gama de fluoróforos. Los restos fluorescente e inactivador pueden estar unidos covalentemente a la sonda en cualquier orientación, ya sea con el fluorescente en o cerca del extremo 5' y el inactivador en o cerca del extremo 3', o viceversa. Se conocen en la técnica protocolos para la síntesis de sondas moleculares fluorescentes ("balizas"). Un protocolo detallado para la síntesis se proporciona en una publicación

titulada "Molecular Beacons: Hybridization Probes for Detection of Nucleic Acids in Homogenous Solutions" de Sanjay Tyagi y col., Department of Molecular Genetics, Public Health Research Institute, 455 First Avenue New York, NY 10016, EE.UU., que está disponible "on line" a través de la página web del PHRI (en [www.phri.nyu.edu](http://www.phri.nyu.edu) o en [www.molecular-balizas.org](http://www.molecular-balizas.org)).

Pueden utilizarse combinaciones adecuadas de los cebadores P1 del NASBA y P2 del NASBA para dirigir una reacción de amplificación mediante NASBA. Para dirigir una reacción de amplificación mediante NASBA, los oligonucleótidos cebador 1 y cebador 2 deben ser capaces de estimular la síntesis de un ADN bicatenario a partir de una región diana del ARNm. Para que esto ocurra, los oligonucleótidos cebador 1 y cebador 2 deben contener secuencias específicas de la diana que sean complementarias a regiones de la cadena codificante y no codificante del ARNm diana, respectivamente.

En la primera fase del ciclo de amplificación mediante NASBA, la denominada fase "no cíclica", el oligonucleótido cebador 1 se hibrida con una secuencia complementaria en el ARNm diana y su extremo 3' es prolongado por la acción de una ADN polimerasa dependiente de ARN (por ejemplo, una transcriptasa inversa) para dar lugar a la síntesis de una primera cadena de ADNc. La cadena de ARN del híbrido ARN:ADN resultante es posteriormente digerida, por ejemplo, mediante la acción de ARNasa H, para dejar un ADN de cadena sencilla. El oligonucleótido cebador 2 se hibrida a una secuencia complementaria hacia el extremo 3' de este ADN monocatenario y su extremo 3' es extendido (por la acción de la transcriptasa inversa), formando un ADN bicatenario. La ARN polimerasa es luego capa de transcribir múltiples copias de ARN a partir de la secuencia promotora ahora transcripcionalmente activa dentro del ADN bicatenario. Este transcrito de ARN, que es no codificante respecto al ARNm diana original, puede actuar como molde para una ronda posterior de reacciones de NASBA, con el cebador 2 hibridándose al ARN y cebando la síntesis de la primera cadena de ADNc y el cebador 1 estimulando la síntesis de la segunda cadena de ADNc. Los principios generales de la reacción del NASBA son bien conocidos en la técnica (véase Compton, J., Nature, 350: 91-92).

Los oligonucleótidos sonda específicos de la diana descritos en el presente documento también pueden unirse a un soporte sólido, tal como microesferas magnéticas, y ser utilizados como "sondas de captura" para inmovilizar el producto de la reacción de amplificación mediante NASBA (un ARN monocatenario). Las sondas "moleculares fluorescentes" ("balizas") específicas de la diana descritos en el presente documento pueden utilizarse para el control en tiempo real de la reacción del NASBA.

Los kits descritos en el presente documento pueden incluir también un control positivo que contenga ARNm de E6 y/o L1 de un tipo de VPH conocido. Los controles adecuados incluyen, por ejemplo, extractos de ácido nucleico preparados a partir de estirpes celulares infectadas con tipos conocidos de VPH (por ejemplo, HeLa, CaSki).

Los kits pueden contener además cebadores de amplificación para control interno, por ejemplo, cebadores específicos para ARN de U1A humano.

Los kits que contienen los cebadores (y opcionalmente sondas) adecuados para su uso en la amplificación mediante NASBA pueden contener además una mezcla de enzimas requerida para la reacción del NASBA, por ejemplo, una mezcla enzimática que contiene una ADN polimerasa dirigida por ARN (por ejemplo, una transcriptasa inversa), una ribonucleasa que hidrolize la cadena de ARN de un híbrido ARN-ADN sin hidrolizar ARN o ADN monocatenario o bicatenario (por ejemplo, ARNasa H) y una ARN polimerasa. La ARN polimerasa debe ser una que reconozca la secuencia promotora presente en la región 5' terminal de los cebadores P1 del NASBA suministrados en el kit de reactivos. El kit puede contener también un suministro de tampón para NASBA que contenga los ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos requeridos para la síntesis de ARN y ADN. La composición de un tampón convencional para la reacción del NASBA será bien conocida por los expertos en la técnica (véase también Leone y col., ídem).

Tabla 1: Secuencias específicas de E6 para ser incluidas en los cebadores y sondas de NASBA/PCR

SEC ID	Tipo de cebador/sonda	Secuencia	Tipo de VPH	nt
1	P2/PCR	CCACAGGAGCGACCCAGAAAAGTTA	16	116
2	P1/PCR	X <sub>1</sub> -ACGGTTTGTGTATTGCTGTTC	16	368
3	P1/PCR	CCACAGGAGCGACCCAGAAA	16	116
4	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GGTTTGTGTATTGCTGTTC	16	368
5	P1/PCR	X <sub>1</sub> -ATCCCATCTCTATACTA	16	258
6	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TCACGTGCGAGTAACTGT	16	208
7	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TTGCTTGCAGTACACACA	16	191
8	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TGCAGTACACACATTCTA	16	186
9	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GCAGTACACACATTCTAA	16	185
10	P2/PCR	ACAGTTATGCACAGAGCT	16	142
11	P2/PCR	ATATTAGAATGTGTGTAC	16	182
12	P2/PCR	TTAGAATGTGTGTACTGC	16	185
13	P2/PCR	GAATGTGTGTACTGCAAG	16	188

ES 2 654 909 T3

SEC ID	Tipo de cebador/sonda	Secuencia	Tipo de VPH	nt
14	PO	ACAGTTATGCACAGAGCT	16	142
15	PO	ATATTAGAATGTGTGTAC	16	182
16	PO	TTAGAATGTGTGTACTGC	16	185
17	PO	GAATGTGTGTACTGCAAG	16	188
18	PO	CTTTGCTTTTCGGGATTTATGC	16	235
19	PO	TATGACTTTGCTTTTCGGGA	16	230
20	MB	X <sub>2</sub> -brazo <sub>1</sub> -TATGACTTTGCTTTTCGGGA-brazo <sub>2</sub> -X <sub>3</sub>	16	230
21	P2/PCR	CAGAGGAGGAGGATGAAATAGTA	16	656
22	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GCACAACCGAAGCGTAGAGTCACAC	16	741
23	PO	TGGACAAGCAGAACCGGACAGAGC	16	687
24	P2/PCR	CAGAGGAGGAGGATGAAATAGA	16	656
25	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GCACAACCGAAGCGTAGAGTCA	16	741
26	PO	AGCAGAACCGGACAGAGCCCATTA	16	693
27	P2/PCR	ACGATGAAATAGATGGAGTT	18	702
28	P1/PCR	X <sub>1</sub> -CACGGACACACAAAGGACAG	18	869
29	PO	AGCCGAACCACAACGTCAACA	18	748
30	P2/PCR	GAAAACGATGAAATAGTGGAG	18	698
31	P1/PCR	X <sub>1</sub> -ACACCACGGACACACAAAGGACAG	18	869
32	PO	GAACCACAACGTCACACAATG	18	752
33	MB	X <sub>2</sub> -brazo <sub>1</sub> -GAACCACAACGTCAACAATG-brazo <sub>2</sub> -X <sub>3</sub>	18	752
34	P2/PCR	TTCCGGTTGACCTTCTATGT	18	651
35	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GGTCGTCTGCTGAGCTTTCT	18	817
36	P2/PCR	GCAAGACATAGAAATAACCTG	18	179
37	P1/PCR	X <sub>1</sub> -ACCCAGTGTTAGTTAGTT	18	379
38	PO	TGCAAGACAGTATTGGAAC	18	207
39	P2/PCR	GGAAATACCCTACGATGAAC	31	164
40	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GGACACAACGGTCTTTGACA	31	423
41	PO	ATAGGGACGACACACCACGGAG	31	268
42	P2/PCR	GGAAATACCCTACGATGAACTA	31	164
43	P1/PCR	X <sub>1</sub> -CTGGACACAACGGTCTTTGACA	31	423
44	PO	TAGGGACGACACACCACCGGA	31	269
45	P2/PCR	ACTGACCTCCACTGTTATGA	31	617
46	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TATCTACTTGTGTGCTCTGT	31	766
47	PO	GACAAGCAGAACCGGACACATC	31	687
48	P2/PCR	TGACCTCCACTGTTATGAGCAATT	31	619
49	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TGCGAATATCTACTTGTGTGCTCT GT	31	766
50	PO	GGACAAGCAGAACCGGACACATCCAA	31	686
51	MB	X <sub>2</sub> -brazo <sub>1</sub> -GGACAAGCAGAACCGGACACATCCAA-brazo <sub>2</sub> -X <sub>3</sub>	31	686
52	P2/PCR	ACTGACCTCCACTGTTAT	31	617
53	P1/PCR	X <sub>1</sub> -CACGATTCCAAATGAGCCCAT	31	809
54	P2/PCR	TATCCTGAACCAACTGACCTAT	33	618
55	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TTGACACATAAACGAACTG	33	763
56	PO	CAGATGGACAAGCACAACC	33	694
57	P2/PCR	TCCTGAACCAACTGACCTAT	33	620
58	P1/PCR	X <sub>1</sub> -CCCATAAGTAGTTGCTGTAT	33	807
59	PO	GGACAAGCACAACCAGCCACAGC	33	699
60	MB	X <sub>2</sub> -brazo <sub>1</sub> -GGACAAGCACAACCAGCCACAGC-brazo <sub>2</sub> -X <sub>3</sub>	33	699
61	P2/PCR	GACCTTTGTGTCTCAAGAA	33	431
62	P1/PCR	X <sub>1</sub> -AGGTCAGTTGGTTCAGGATA	33	618
63	PO	AGAAACTGCACTGTGACGTGT	33	543
64	P2/PCR	ATTACAGCGGAGTGAGGTAT	35	217
65	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GTCTTTGCTTTTCAACTGGA	35	442
66	PO	ATAGAGAAGGCCAGCCATAT	35	270
67	P2/PCR	TCAGAGGAGGAGGAAGATACTA	35	655
68	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GATTATGCTCTCTGTGAACA	35	844
69	P2/PCR	CCCGAGGCAACTGACCTATA	35	610
70	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GTCAATGTGTGTGCTCTGTA	35	770
71	PO	GACAAGCAAAACCAGACACCTCCAA	35	692
72	PO	GACAAGCAAAACCAGACACC	35	692

ES 2 654 909 T3

SEC ID	Tipo de cebador/sonda	Secuencia	Tipo de VPH	nt
73	P2/PCR	TTGTGTGAGGTGCTGGAAGAAT	52	144
74	P1/PCR	X <sub>1</sub> -CCCTCTCTTCTAATGTTT	52	358
75	PO	GTGCCTACGCTTTTTATCTA	52	296
76	P2/PCR	GTGCCTACGCTTTTTATCTA	52	296
77	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GGGGTCTCCAACACTCTGAACA	52	507
78	PO	TGCAAACAAGCGATTTC	52	461
79	P2/PCR	TCAGGCGTTGGAGACATC	58	157
80	P1/PCR	X <sub>1</sub> -AGCAATCGTAAGCACACT	58	301
81	P2/PCR	TCTGTGCATGAAATCGAA	58	173
82	P1/PCR	X <sub>1</sub> -AGCACACTTTACATACTG	58	291
83	PO	TGAAATGCGTTGAATGCA	58	192
84	PO	TTGCAGCGATCTGAGGTATATG	58	218
85	P2/PCR	TACACTGCTGGACAACAT	B (11)	514
86	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TCATCTTCTGAGCTGTCT	B (11)	619
87	P2/PCR	TACACTGCTGGACAACATGCA	B (11)	514
88	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GTCACATCCACAGCAACAGGTCA	B (11)	693
89	PO	GTAGGGTTACATTGCTATGA	B (11)	590
90	PO	GTAGGGTTACATTGCTATGAGC	B (11)	590
91	P2/PCR	TGACCTGTTGCTGTGGATGTGA	B (11)	693
92	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TACCTGAATCGTCCGCCAT	B (11)	832
93	PO	ATWGTGTGCCCATCTGC	B (11)	794
94	P2/PCR	CATGCCATAAATGTATAGA	C (18 39 45)	295
95	P1/PCR	X <sub>1</sub> -CACCGCAGGCACCTTATTA	C (18 39 45)	408
96	PO	AGAATTAGAGAATTAAGA	C (18 39 45)	324
97	P2/PCR	GCAGACGACCACTACAGCAAA	39	210
98	P1/PCR	X <sub>1</sub> -ACACCGAGTCCGAGTAATA	39	344
99	PO	ATAGGGACGGGGAACCACT	39	273
100	P2/PCR	TATTACTCGGACTCGGTGT	39	344
101	P1/PCR	X <sub>1</sub> -CTTGGGTTTCTCTTCGTGTTA	39	558
102	PO	GGACCACAAAACGGGAGGAC	39	531
103	P2/PCR	GAAATAGATGAACCCGACCA	39	703
104	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GCACACCACGGACACACAAA	39	886
105	PO	TAGCCAGACGGGATGAACCACAGC	39	749
106	P2/PCR	AACCATTGAACCCAGCAGAAA	45	430
107	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TCTTTCTTGCCGTGCCTGGTCA	45	527
108	P2/PCR	GTACCGAGGGCAGTGTAAATA	45	500
109	P2/PCR	AACCATTGAACCCAGCAGAAA	45	430
110	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TCTTTCTTGCCGTGCCTGGTCA	45	527
111	P2/PCR	GAAACCATTGAACCCAGCAGAAAA	45	428
112	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TTGCTATACTTGTGTTTCCCTACG	45	558
113	PO	GTACCGAGGGCAGTGTAAATA	45	500
114	PO	GGACAAACGAAGATTTTACA	45	467
115	P2/PCR	GTTGACCTGTTGTGTTACCAGCAAT	45	656
116	P1/PCR	X <sub>1</sub> -CACACGGACACACAAAAGGACAAG	45	868
117	P2/PCR	CTGTTGACCTGTTGTGTTACGA	45	654
118	P1/PCR	X <sub>1</sub> -CCACGGACACACAAAAGGACAAG	45	868
119	P2/PCR	GTTGACCTGTTGTGTTACGA	45	656
120	P1/PCR	X <sub>1</sub> -ACGGACACACAAAAGGACAAG	45	868
121	PO	GAGTCAGAGGAGGAAAACGATG	45	686
122	PO	AGGAAAACGATGAAGCAGATGGAGT	45	696
123	PO	ACAACCTACCAGCCCAGCAGCCGAA	45	730
124	P2/PCR	GGAGGAGGATGAAGTAGATA	51	658
125	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GCCCATTAACATCTGCTGTA	51	807
126	P2/PCR	AGAGGAGGAGGATGAAGTAGATA	51	655
127	P1/PCR	X <sub>1</sub> -ACGGGCAAACAGGCTTAGT	51	829
128	PO	GCAGGTGTTCAAGTGTAGTA	51	747
129	PO	TGGCAGTGGAAGCAGTGGAGACA	51	771
130	P2/PCR	TTGGGGTGCTGGAGACAAACATCT	56	519

SEC ID	Tipo de cebador/sonda	Secuencia	Tipo de VPH	nt
131	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TTCATCCTCATCCTCATCCTCTGA	56	665
132	P2/PCR	TGGGGTGCTGGAGACAAACATC	56	520
133	P1/PCR	X <sub>1</sub> -CATCCTCATCCTCATCCTCTGA	56	665
134	P2/PCR	TTGGGGTGCTGGAGACAAACAT	56	519
135	P1/PCR	X <sub>1</sub> -CCACAAACTTACACTCACAACA	56	764
136	PO	AAAGTACCAACGCTGCAAGACGT	56	581
137	PO	AGAACTAACACCTCAAACAGAAAT	56	610
138	PO	AGTACCAACGCTGCAAGACGTT	56	583
139	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TTGGACAGCTCAGAGGATGAGG	56	656
140	P2/PCR	GATTTTCCTTATGCAGTGTG	56	279
141	P1/PCR	X <sub>1</sub> -GACATCTGTAGCACCTTATT	56	410
142	PO	GACTATTCAGTGTATGGAGC	56	348
143	PO	CAACTGAYCTMYACTGTTATGA	A (16 31 35)	
144	MB	X <sub>2</sub> -brazo <sub>1</sub> -CAACTGAYCTMYACTGTTATGA-brazo <sub>2</sub> -X <sub>3</sub>	A (16 31 35)	
145	PO	GAAMCAACTGACCTAYWCTGCTAT	A (33 52 58)	
146	MB	X <sub>2</sub> -brazo <sub>1</sub> -GAAMCAACTGACCTAYWCTGCTAT-brazo <sub>2</sub> -X <sub>3</sub>	A (33 52 58)	
147	PO	AAGACATTATTCAGACTC	C (18 45 39)	
148	MB	X <sub>2</sub> -brazo <sub>1</sub> -AAGACATTATTCAGACTC-brazo <sub>2</sub> -X <sub>3</sub>	C (18 45 39)	

Tabla 2: Secuencias específicas de L1 para ser incluidas en los cebadores y sondas de NASBA/PCR

SEC ID	Tipo de cebador/sonda	Secuencia
149	P2/PCR	AATGGCATTGTTGGGGTAA
150	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TCATATTCCTCCCATGTC
151	PO	TTGTTACTGTTGTTGATACTAC
152	P2/PCR	AATGGCATTGTTGGSRHAA
153	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TCATATTCCTCMCATGDC
154	PO	TTGTTACTGTTGTTGATACYAC
155	PO	TTGTTACTGTTGTTGATACCAC
156	P2/PCR	AATGGCATTGTTGGSIIAA
157	P2/PCR	AATGGCATTGTTGGIIHAA
158	P2/PCR	AATGGCATTGTTGGIRIAA
159	P2/PCR	AATGGCATTGTTGGGGTAA
160	P2/PCR	AATGGCATTGTTGGGGAAA
161	P2/PCR	AATGGCATTGTTGGCATAA
162	P2/PCR	AATGGCATTGTTGGGGCAA
163	P2/PCR	AATGGCATTGTTGGCACAA
164	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TCATATTCCTCMICATGIC
165	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TCATATTCCTCAACATGIC
166	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TCATATTCCTCIICATGTC
167	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TCATATTCCTCIICATGGC
168	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TCATATTCCTCIICATGAC 3'
169	P1/PCR	X <sub>1</sub> -TCATATTCCTCIICATGCC 3'

5 Los cebadores preferidos adecuados para su uso en la detección del ARNm de L1 y E6 del VPH mediante NASBA se enumeran en las tablas siguientes. Sin embargo, éstos son meramente ilustrativos y no se desea que el ámbito de la invención se limite a estas moléculas específicas.

10 En las tablas siguientes, los cebadores P2 del NASBA (p2) incluyen la secuencia GATGCAAGTTCGCATATGAG en el extremo 5'; los cebadores P1 del NASBA (p1) incluyen la secuencia AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGG en el extremo 5'. Los oligonucleótidos adecuados para su uso como sondas se identifican por "po". Los cebadores P2 contienen generalmente secuencias del VPH procedentes de la cadena positiva, mientras que los cebadores p1 contienen generalmente secuencias del VPH procedentes de la cadena negativa. nt se refiere a la posición de los nucleótidos en la secuencia genómica del VPH relevante.

15

Tabla 3: Cebadores y sondas preferidos para el NASBA de E6

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de VPH	de nt
HAe6701p2	GATGCAAGGTTCGCATATGAGCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTA	16	116
HAe6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGACGGTTTGTGTAT TGCTGTTC	16	368
HAe6702p2	GATGCAAGGTTCGCATATGAGCCACAGGAGCGACCCAGAAA	16	116
HAe6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGTTTGTGTATTG CTGTTC	16	368
HPV16p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGATTCCCATCTCTAT ATACTA	16	258
HAe6702Ap1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCACGTTCGAGTAA CTGT	16	208
HAe6702Bp1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTTGCTTGCAGTACA CACA	16	191
HAe6702Cp1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCAGTACACACAT TCTA	16	186
HAe6702Dp1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCAGTACACACATT CTAA	16	185
H16e6702Ap2	GATGCAAGGTTCGCATATGAGACAGTTATGCACAGAGCT	16	142
H16e6702Bp2	GATGCAAGGTTCGCATATGAGATATTAGAATGTGTGTAC	16	182
H16e6702Cp2	GATGCAAGGTTCGCATATGAGTTAGAATGTGTGTACTGC	16	185
H16e6702Dp2	GATGCAAGGTTCGCATATGAGGAATGTGTGTACTGCAAG	16	188
H16e6702Apo	ACAGTTATGCACAGAGCT	16	142
H16e6702Bpo	ATATTAGAATGTGTGTAC	16	182
H16e6702Cpo	TTAGAATGTGTGTACTGC	16	185
H16e6702Dpo	GAATGTGTGTACTGCAAG	16	188
HAe6701po	CTTTGCTTTTCGGGATTTATGC	16	235
HAe6702po	TATGACTTTGCTTTTCGGGA	16	230
HAe6701mb1	X <sub>2</sub> -cgcatgTATGACTTTGCTTTTCGGGAcatg-X <sub>3</sub>	16	230
HAe6701mb2	X <sub>2</sub> -ccagctTATGACTTTGCTTTTCGGGAagctg-X <sub>3</sub>	16	230
HAe6701mb3	X <sub>2</sub> -cacgcTATGACTTTGCTTTTCGGGAgcgtg-X <sub>3</sub>	16	230
HAe6701mb4	X <sub>2</sub> -cgatcgTATGACTTTGCTTTTCGGGAcgatcg-X <sub>3</sub>	16	230
HAe6703p2	GATGCAAGGTTCGCATATGAGCAGAGGAGGAGGATGAAATAGTA	16	656
HAe6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCACAAACCGAAGC GTAGAGTCACAC	16	741
HAe6703po	TGGACAAGCAGAACCGGACAGAGC	16	687
HAe6704p2	GATGCAAGGTTCGCATATGAGCAGAGGAGGAGGATGAAATAGA	16	656
HAe6704p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCACAAACCGAAGC GTAGAGTCA	16	741
HAe6704po	AGCAGAACCGGACAGACCCATTA	16	693
H18e6701p2	GATGCAAGGTTCGCATATGAGACGATGAAATAGATGGAGTT	18	702
H18e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACGGACACACAAA GGACAG	18	869
H18e6701po	AGCCGAACCCACAACGTCACA	18	748
H18e6702p2	GATGCAAGGTTCGCATATGAGGAAAACGATGAAATAGATGGAG	18	698
H18e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGACACCACGGACAC ACAAAGGACAG	18	869
H18e6702po	GAACCACAACGTCACACAATG	18	752
H18e6702mb1	X <sub>2</sub> -cgcatgGAACCACAACGTCACACAATGcatg-X <sub>3</sub>	18	752
H18e6702mb2	X <sub>2</sub> -ccgtcgGAACCACAACGTCACACAATGcgacg-X <sub>3</sub>	18	752
H18e6702mb3	X <sub>2</sub> -cggaccGAACCACAACGTCACACAATGggtccg-X <sub>3</sub>	18	752
H18e6702mb4	X <sub>2</sub> -cgatcgGAACCACAACGTCACACAATGcgatcg-X <sub>3</sub>	18	752
H18e6703p2	GATGCAAGGTTCGCATATGAGTTCCGGTTGACCTTCTATGT	18	651
H18e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGTTCGTCTGCTGA GCTTTCT	18	817
H18e6704p2	GATGCAAGGTTCGCATATGAGGCAAGACATAGAAATAACCTG	18	179
H18e6704p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGACCCAGTGTAGTT AGTT	18	379
H18e6704po	TGCAAGACAGTATTGGAAC	18	207
H31e6701p2	GATGCAAGGTTCGCATATGAGGGAAATACCTACGATGAAC	31	164
H31e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGGACACAACGGTC TTTGACA	31	423

ES 2 654 909 T3

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de VP	nt
H31e6701po	ATAGGGACGACACACCACACGGAG	31	268
H31e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGGAAATACCCTACGATGAACTA	31	164
H31e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGCTGGACACAACGGTCTTTGACA	31	423
H31e6702po	TAGGGACGACACACCACACGGGA	31	269
H31e6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGACTGACCTCCACTGTTATGA	31	617
H31e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGTATCTACTTGTGTGCTCTGT	31	766
H31e6703po	GACAAGCAGAACCGGACACATC	31	687
H31e6704p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTGACCTCCACTGTTATGAGCAATT	31	619
H31e6704p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGTGCGAATATCTACTGTGTGCTCT GT	31	766
H31e6704po	GGACAAGCAGAACCGGACACATCCAA	31	686
H31e6704mb1	X <sub>2</sub> -ccgaaggGGACAAGCAGAACCGGACACATCCAAccttcgg-X <sub>3</sub>	31	686
H31e6704mb2	X <sub>2</sub> -ccgtcgGGACAAGCAGAACCGGACACATCCAAcgcg-X <sub>3</sub>	31	686
H31e6704mb3	X <sub>2</sub> -cacgtcgGGACAAGCAGAACCGGACACATCCAAcgcgtg-X <sub>3</sub>	31	686
H31e6704mb4	X <sub>2</sub> -cgcagcGGACAAGCAGAACCGGACACATCCAAcgcg-X <sub>3</sub>	31	686
H31e6704mb5	X <sub>2</sub> -cgatcgGGACAAGCAGAACCGGACACATCCAAcgcg-X <sub>3</sub>	31	686
H31e6705p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGACTGACCTCCACTGTTAT	31	617
H31e6705p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGCACGATTCCAAATGAGCCCAT	31	809
H33e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTATCCTGAACCAACTGACCTAT	33	618
H33e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGTTGACACATAAACGAACTG	33	763
H33e6701po	CAGATGGACAAGCACAACC	33	694
H33e6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTCTGAACCAACTGACCTAT	33	620
H33e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGCCATAAGTAGTTGCTGTAT	33	807
H33e6703po	GGACAAGCACAACCAGCCACAGC	33	699
H33e6703mb1	X <sub>2</sub> -ccaagcGGACAAGCACAACCAGCCACAGCgcttgg-X <sub>3</sub>	33	699
H33e6703mb2	X <sub>2</sub> -ccaagcgGGACAAGCACAACCAGCCACAGCcgcttgg-X <sub>3</sub>	33	699
H33e6703mb3	X <sub>2</sub> -cccagcGGACAAGCACAACCAGCCACAGCgcttgg-X <sub>3</sub>	33	699
H33e6703mb4	X <sub>2</sub> -ccaaagcGGACAAGCACAACCAGCCACAGCgcttgg-X <sub>3</sub>	33	699
H33e6703mb5	X <sub>2</sub> -cctgcGGACAAGCACAACCAGCCACAGCgcagg-X <sub>3</sub>	33	699
H33e6703mb6	X <sub>2</sub> -cgatcgGGACAAGCACAACCAGCCACAGCcgatcg-X <sub>3</sub>	33	699
H33e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGACCTTTGTCTCCTCAAGAA	33	431
H33e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGAGGTCAGTTGGTTCAGGATA	33	618
H33e6702po	AGAACTGCACTGTGACGTGT	33	543
H35e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGATTACAGCGGAGTGAGGTAT	35	217
H35e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGGTCTTTGCTTTTCAACTGGA	35	442
H35e5601po	ATAGAGAAGGCCAGCCATAT	35	270
H35e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTCAGAGGAGGAGGAAGATACTA	35	655
H35e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGGATTATGCTCTCTGTGAACA	35	844
H35e6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGCCCAGGCAACTGACCTATA	35	610
H35e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGGTCAATGTGTGTGCTCTGTA	35	770
H35e6702po	GACAAGCAAAAACCAGACACCTCCAA	35	692
H35e6703po	GACAAGCAAAAACCAGACACC	35	692
H52e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTTGTGTGAGGTGCTGGAAGAAT	52	144
H52e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGCCCTCTCTTCTAATGTTT	52	358
H52e6701po	GTGCCTACGCTTTTTATCTA	52	296
H52e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGTGCCTACGCTTTTTATCTA	52	296
H52e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGGGGTCTCCAACA CTCTGAACA	52	507
H52e6702po	TGCAACAAGCGATTTCA	52	461
H58e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTCAGGCGTTGGAGACATC	58	157

ES 2 654 909 T3

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de VPH	nt
H58e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGAGCAATCGTAAGCACT	58	301
H58e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTCTGTGCATGAAATCGAA	58	173
H58e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGAGCACACTTTACATCTG	58	291
H58e6701po	TGAAATGCGTTGAATGCA	58	192
H58e6702po	TTGCAGCGATCTGAGGTATATG	58	218
HBe6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTACACTGCTGGACAACAT	B (11)	514
HBe6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATCTTCTGAGCTGTCT	B (11)	619
HBe6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTACACTGCTGGACAACATGCA	B (11)	514
HBe6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGTCACATCCACAGCAACAGGTCA	B (11)	693
HBe6701po	GTAGGGTTACATTGCTATGA	B (11)	590
HBe6702po	GTAGGGTTACATTGCTATGAGC	B (11)	590
HBe6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTACACTGTTGCTGTGGATGTGA	B (11)	693
HBe6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTACCTGAATCGTCCGCCAT	B (11)	832
HBe6703po	ATWGTGTGTCCCATCTGC	B (11)	794
HCe6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGCATGCCATAAATGTATAGA	C (18 39 45)	295
HCe6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACCCGAGGCACCTTATTAA	C (18 39 45)	408
HCe6701po	AGAATTAGAGAATTAAGA	C (18 39 45)	324
H39e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGCAGACGACCACTACAGCAAA	39	210
H39e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGACACCGAGTCCGAGTAATA	39	344
H39e6701po	ATAGGGACGGGGAACCACT	39	273
H39e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTATTACTCGGACTCGGTGT	39	344
H39e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTTGGGTTTCTCTTCGTGTTA	39	558
H39e6702po	GGACCACAAAACGGGAGGAC	39	531
H39e6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGAAATAGATGAACCCGACCA	39	703
H39e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCACACCACGGACACACAAA	39	886
H39e6703po	TAGCCAGACGGGATGAACCACAGC	39	749
HPV45p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGAACCATTGAACCCAGCAGAAA	45	430
HPV45p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCTTTCTTGCCGTGCCTGGTCA	45	527
HPV45po	GTACCGAGGGCAGTGTAAATA	45	500
H45e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGAACCATTGAACCCAGCAGAAA	45	430
H45e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCTTTCTTGCCGTGCCTGGTCA	45	527
H45e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGAAACCATTGAACCCAGCAGAAAA	45	428
H45e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTTGCTATACTTGTGTTTCCCTACG	45	558
H45e6701po	GTACCGAGGGCAGTGTAAATA	45	500
H45e6702po	GGACAAACGAAGATTTTACA	45	467
H45e6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGTTGACCTGTTGTGTTACCAGCAATAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACCACGGACACACAAAGGACAAG	45	656
H45e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACCACGGACACACAAAGGACAAG	45	868
H45e6704p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGCTGTTGACCTGTTGTGTTACGA	45	654
H45e6704p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCACGGACACACA AAGGACAAG	45	868
H45e6705p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGTTGACCTGTTGTGTTACGA	45	656
H45e6705p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGACGGACACACAAA GGACAAG	45	868
H45e6703po	GAGTCAGAGGAGGAAAACGATG	45	686
H45e6704po	AGGAAAACGATGAAGCAGATGGAGT	45	696
H45e6705po	ACAACCTACCAGCCCGACGAGCCGAA	45	730
H51e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGGAGGAGGATGAAGTAGATA	51	658

ES 2 654 909 T3

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de VPH	de nt
H51e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGGCCCATTAACATCTGCTGTA	51	807
H51e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGAGAGGAGGAGGATGAAGTAGATA	51	655
H51e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGACGGGCAAACCAGGCTTAGT	51	829
H51e6701po	GCAGGTGTTCAAGTGTAGTA	51	747
H51e6702po	TGGCAGTGGAAAGCAGTGGAGACA	51	771
H56e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTTGGGGTGCTGGAGACAAACATCT	56	519
H56e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGTTTCATCCTCATCCTCATCCTCTGA	56	665
H56e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTGGGGTGCTGGAGACAAACATC	56	520
H56e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGCATCCTCATCCTCATCCTCTGA	56	665
H56e6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTTGGGGTGCTGGAGACAAACAT	56	519
H56e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGCCACAAACTTACACTCACAACA	56	764
H56e6701po	AAAGTACCAACGCTGCAAGACGT	56	581
H56e6702po	AGAACTAACACCTCAAACAGAAAT	56	610
H56e6703po	AGTACCAACGCTGCAAGACGTT	56	583
H56e6703po1	TTGGACAGCTCAGAGGATGAGG	56	656
H56e6704p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGATTTTCCTTATGCAGTGTG	56	279
H56e6704p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGGGACATCTGTAGCACCTTATT	56	410
H56e6704po	GACTATTCAGTGTATGGAGC	56	348
HPVAPO1A	CAACTGAYCTMYACTGTTATGA	A (16 31 35)	
HPVApo1Amb1	X <sub>2</sub> -cgcatgCAACTGAYCTMYACTGTTATGAcatgcg-X <sub>3</sub>	A (16 31 35)	
HPVApo1Amb2	X <sub>2</sub> -ccgtcgCAACTGAYCTMYACTGTTATGAcgacgg-X <sub>3</sub>	A (16 31 35)	
HPVApo1Amb3	X <sub>2</sub> -ccaccCAACTGAYCTMYACTGTTATGAgggtgg-X <sub>3</sub>	A (16 31 35)	
HPVApo1Amb4	X <sub>2</sub> -cgatcgCAACTGAYCTMYACTGTTATGAcgatcg-X <sub>3</sub>	A (16 31 35)	
HPVAPO4A	GAAMCAACTGACCTAYWCTGCTAT	A (33 52 58)	
HPVAPO4Amb1	X <sub>2</sub> -ccaagcGAAMCAACTGACCTAYWCTGCTATgcttg-X <sub>3</sub>	A (33 52 58)	
HPVAPO4Amb2	X <sub>2</sub> -ccaagccGAAMCAACTGACCTAYWCTGCTATggcttg-X <sub>3</sub>	A (33 52 58)	
HPVAPO4Amb3	X <sub>2</sub> -ccaagcgGAAMCAACTGACCTAYWCTGCTATcgcttg-X <sub>3</sub>	A (33 52 58)	
HPVAPO4Amb4	X <sub>2</sub> -ccagcgGAAMCAACTGACCTAYWCTGCTATcgcttg-X <sub>3</sub>	A (33 52 58)	
HPVAPO4Amb5	X <sub>2</sub> -cgatcgGAAMCAACTGACCTAYWCTGCTATcgatcg-X <sub>3</sub>	A (33 52 58)	
HPVCPO4	AAGACATTATTCAGACTC	C (18 45 39)	
HPVCPO4Amb1	X <sub>2</sub> -ccaagcAAGACATTATTCAGACTCgcttg-X <sub>3</sub>	C (18 45 39)	
HPVCPO4Amb2	X <sub>2</sub> -cgcatgAAGACATTATTCAGACTCcatgcg-X <sub>3</sub>	C (18 45 39)	
HPVCPO4Amb3	X <sub>2</sub> -cccagcAAGACATTATTCAGACTCgctggg-X <sub>3</sub>	C (18 45 39)	
HPVCPO4Amb4	X <sub>2</sub> -cgatcgAAGACATTATTCAGACTCcgatcg-X <sub>3</sub>	C (18 45 39)	

Los pares de cebadores P1 y P2 que tienen el mismo prefijo (por ejemplo, HAe6701p1 y HAe6701p2) tienen por objeto ser utilizados en combinación. Sin embargo, pueden utilizarse también otras combinaciones, según se resume a continuación, para los tipos de VPH 16, 18, 31, 33 y 45.

## ES 2 654 909 T3

Pares de cebadores adecuados para la amplificación del ARNm de E6 del VPH 16 son como se indica a continuación:

5 HAe6701p2 o HAe6702p2 (ambos 116 nt) con HAe6701p1 o HAe6702p1 (ambos 368 nt).

HAe6701p2 o HAe6702p2 (ambos 116 nt) con HPV16p1 (258 nt).

10 H16e6702Ap2 (142 nt), H16e6702Bp2 (182 nt), H16e6702Cp2 (185 nt) o H16e6702Dp2 (188 nt) con HAe6701p1 o HAe6702p1 (ambos 368 nt).

10 HAe6701p2 o HAe6702p2 (ambos 116 nt) con HAe6702Ap1 (208 nt), HAe6702Bp1 (191 nt), HAe6702Cp1 (186 nt) o HAe6702Dp1 (185 nt). Estas combinaciones son adecuadas para la amplificación de todas las variantes por corte y empalme de E6.

15 HAe6703p2 o HAe6704p2 (ambos 656 nt) con HAe6703p1 o HAe6704p1 (ambos 741 nt). Estas combinaciones son adecuadas para la amplificación de todos los transcritos que contienen la región codificadora de E7 (al menos hasta el nt 741).

Se prefieren los pares de cebadores siguientes para la amplificación del ARNm de E6 del VPH 18:

20 H18e6701p2 (702 nt) o H18e6702p2 (698 nt) con H18e6701p1 o H18e6702p1 (ambos 869 nt).

H18e6703p2 (651 nt) con H18e6703p1 (817 nt).

25 H18e6704p2 (179 nt) con H18e6704p1 (379 nt).

Se prefieren los pares de cebadores siguientes para la amplificación del ARNm de E6 del VPH 31:

30 H31e6701p2 o H31e6702p2 (ambos 164 nt) con H31e6701p1 o H31e6702p1 (ambos 423 nt).  
H31e6703p2 (617 nt), H31e6704p2 (619 nt) o H31e6705p2 (617 nt) con H31e6703p1 (766 nt), H31e6704p1 (766 nt) o H31e6705p1 (809 nt).

Se prefieren los pares de cebadores siguientes para la amplificación del ARNm de E6 del VPH 33:

35 H33e6701p2 (618 nt) o H33e6703p2 (620 nt) con H33e6701p1 (763 nt) o H33e6703p1 (807 nt).

H33e6702p2 (431 nt) con H33e6702p1 (618 nt).

Se prefiere el par de cebadores siguiente para la amplificación de VPH 45:

40 HPV45p2 (430 nt) con HPV45p1 (527 nt).

Tabla 4: Cebadores para la PCR de E6

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de VPH	nt
HAe6701PCR2	CCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTA	16	116
HAe6701PCR1	ACGGTTTGTGTATTGCTGTTC	16	368
HAe6702PCR2	CCACAGGAGCGACCCAGAAA	16	116
HAe6702PCR1	GGTTTGTGTATTGCTGTTC	16	368
HAe6703PCR2	CAGAGGAGGAGGATGAAATAGTA	16	656
HAe6703PCR1	GCACAACCGAAGCGTAGAGTCACAC	16	741
HAe6704PCR2	CAGAGGAGGAGGATGAAATAGA	16	656
HAe6704PCR1	GCACAACCGAAGCGTAGAGTCA	16	741
H18e6701PCR2	ACGATGAAATAGATGGAGTT	16	702
H18e6701PCR1	CACGGACACACAAAGGACAG	18	869
H18e6702PCR2	GAAAACGATGAAATAGATGGAG	18	698
H18e6702PCR1	ACACCACGGACACACAAAGGACAG	18	869
H18e6703PCR2	TTCCGGTTGACCTTCTATGT	18	651
H18e6703PCR1	GGTCGTCTGCTGAGCTTTCT	18	817
H18e6704PCR2	GCAAGACATAGAAATAACCTG	18	179
H18e6704PCR1	ACCCAGTGTTAGTTAGTT	18	379
H31e6701PCR2	GGAAATACCCTACGATGAAC	31	164
H31e6701PCR1	GGACACAACGGTCTTTGACA	31	423
H31e6702PCR2	GGAAATACCCTACGATGAAC	31	164
H31e6702PCR1	CTGGACACAACGGTCTTTGACA	31	423
H31e6703PCR2	ACTGACCTCCACTGTTATGA	31	617

ES 2 654 909 T3

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de VPH	nt
H31e6703PCR1	TATCTACTTGTGTGCTCTGT	31	766
H31e6704PCR2	TGACCTCCACTGTTATGAGCAATT	31	619
H31e6704PCR1	TGCGAATATCTACTTGTGTGCTCT GT	31	766
H31e6705PCR2	ACTGACCTCCACTGTTAT	31	617
H31e6705PCR1	CACGATTCCAAATGAGCCCAT	31	809
H33e6701PCR2	TATCCTGAACCAACTGACCTAT	33	618
H33e6701PCR1	TTGACACATAAACGAACTG	33	763
H33e6703PCR2	TCCTGAACCAACTGACCTAT	33	620
H33e6703PCR1	CCCATAAGTAGTTGCTGTAT	33	807
H33e6702PCR2	GACCTTTGTGTCCTCAAGAA	33	431
H33e6702PCR1	AGGTCAGTTGGTTCAGGATA	33	618
H35e6701PCR2	ATTACAGCGGAGTGAGGTAT	35	217
H35e6701PCR1	GTCTTTGCTTTTCAACTGGA	35	442
H35e6702PCR2	TCAGAGGAGGAGGAAGATACTA	35	655
H35e6702PCR1	GATTATGCTCTCTGTGAACA	35	844
H35e6703PCR2	CCCGAGGCAACTGACCTATA	35	610
H35e6703PCR1	GTCAATGTGTGTGCTCTGTA	35	770
H52e6701PCR2	TTGTGTGAGGTGCTGGAAGAAT	52	144
H52e6701PCR1	CCCTCTTCTAATGTTT	52	358
H52e6702PCR2	GTGCCTACGCTTTTTATCTA	52	296
H52e6702PCR1	GGGGTCTCCAACACTCTGAACA	52	507
H58e6701PCR2	TCAGGCGTTGGAGACATC	58	157
H58e6701PCR1	AGCAATCGTAAGCACACT	58	301
H58e6702PCR2	TCTGTGCATGAAATCGAA	58	173
H58e6702PCR1	AGCACACTTTACATACTG	58	291
HBe6701PCR2	TACACTGCTGGACAACAT	B (11)	514
HBe6701PCR1	TCATCTTCTGAGCTGTCT	B (11)	619
HBe6702PCR2	TACACTGCTGGACAACATGCA	B (11)	514
HBe6702PCR1	GTCACATCCACAGCAACAGGTCA	B (11)	693
HBe6703PCR2	TGACCTGTTGCTGTGGATGTGA	B (11)	693
HBe6703PCR1	TACCTGAATCGTCCGCCAT	B (11)	832
HCe6701PCR2	CATGCCATAAATGTATAGA	C (18 39 45)	295
HCe6701PCR1	CACCGCAGGCACCTTATTAA	C (18 39 45)	408
H39e6701PCR2	GCAGACGACCACTACAGCAAA	39	210
H39e6701PCR1	ACACCGAGTCCGAGTAATA	39	344
H39e6702PCR2	TATTACTCGGACTCGGTGT	39	344
H39e6702PCR1	CTTGGGTTTCTTTCGTGTTA	39	558
H39e6703PCR2	GAAATAGATGAACCCGACCA	39	703
H39e6703PCR1	GCACACCACGGACACACAAA	39	886
H45e6701PCR2	AACCATTGAACCCAGCAGAAAA	45	430
H45e6701PCR1	TCTTTCTTGCCGTGCCTGGTCA	45	527
H45e6702PCR2	GAAACCATTGAACCCAGCAGAAAA	45	428
H45e6702PCR1	TTGCTATACTTGTGTTCCCTACG	45	558
H45e6703PCR2	GTTGACCTGTTGTGTTACCAGCAAT	45	656
H45e6703PCR1	CACCACGGACACACAAAGGACAAG	45	868
H45e6704PCR2	CTGTTGACCTGTTGTGTTACGA	45	654
H45e6704PCR1	CCACGGACACACAAAGGACAAG	45	868
H45e6705PCR2	GTTGACCTGTTGTGTTACGA	45	656
H45e6705PCR1	ACGGACACACAAAGGACAAG	45	868
H51e6701PCR2	GGAGGAGGATGAAGTAGATA	51	658
H51e6701PCR1	GCCCATTAAACATCTGCTGTA	51	807
H51e6702PCR2	AGAGGAGGAGGATGAAGTAGATA	51	655
H51e6702PCR1	ACGGGCAAACCAGGCTTAGT	51	829
H56e6701PCR2	TTGGGGTGTCTGGAGACAAACATCT	56	519
H56e6701PCR1	TTCATCCTCATCCTCATCCTCTGA	56	665
H56e6702PCR2	TGGGGTGTCTGGAGACAAACATC	56	520
H56e6702PCR1	CATCCTCATCCTCATCCTCTGA	56	665
H56e6703PCR2	TTGGGGTGTCTGGAGACAAACAT	56	519
H56e6703PCR1	CCACAAACTTACACTCACACA	56	764
H56e6704PCR2	GATTTTCCTTATGCAGTGTG	56	279
H56e6704PCR1	GACATCTGTAGCACCTTATT	56	410

Los pares de cebadores para PCR preferidos para los tipos de VPH 16, 18, 31 y 33 son análogos a los pares de cebadores para el NASBA.

Tabla 5: Cebadores y sondas preferidos para el NASBA de L1

Nombre del cebador	Secuencia
Onc2A2	5' GATGCAAGGTTCGCATATGAGAATGGCATTGTTGGGGTAA 3'
Onc2A1	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCCCCATGTC 3'
Onc2PoA	5' TTGTTACTGTTGTTGATACTAC 3'
Onc2B2	5' GATGCAAGGTTCGCATATGAGAATGGCATTGTTGGSRHAA 3'
Onc2B1	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCMMCATGDC 3'
Onc2PoB	5' TTGTTACTGTTGTTGATACYAC 3'
Onc2PoC	5' TTGTTACTGTTGTTGATACCAC 3'
Onc2C2	5' GATGCAAGGTTCGCATATGAGAATGGCATTGTTGGSIIAA 3'
Onc2D2	5' GATGCAAGGTTCGCATATGAGAATGGCATTGTTGGIIHAA 3'
Onc2E2	5' GATGCAAGGTTCGCATATGAGAATGGCATTGTTGGIRIAA 3'
Onc2F2	5' GATGCAAGGTTCGCATATGAGAATGGCATTGTTGGGGTAA 3'
Onc2G2	5' GATGCAAGGTTCGCATATGAGAATGGCATTGTTGGGGAAA 3'
Onc2H2	5' GATGCAAGGTTCGCATATGAGAATGGCATTGTTGGCATAA 3'
Onc2I2	5' GATGCAAGGTTCGCATATGAGAATGGCATTGTTGGGGCAA 3'
Onc2J2	5' GATGCAAGGTTCGCATATGAGAATGGCATTGTTGGCACAA 3'
Onc2K2	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCMICATGIC 3'
Onc2L2	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCAACATGIC 3'
Onc2M2	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCIICATGTC 3'
Onc2N2	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCIICATGGC 3'
Onc2O2	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCIICATGAC 3'
Onc2P2	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCIICATGCC 3'

5

Tabla 6: Cebadores preferidos para la PCR de L1

Nombre del cebador	Secuencia
Onc2A1-PCR	5' AATGGCATTGTTGGGGTAA 3'
Onc2A2-PCR	5' TCATATTCCTCCCCATGTC 3'
Onc2B1-PCR	5' AATGGCATTGTTGGSRHAA 3'
Onc2B2-PCR	5' TCATATTCCTCMMCATGDC 3'
Onc2C1-PCR	5' AATGGCATTGTTGGSIIAA 3'
Onc2D1-PCR	5' AATGGCATTGTTGGIIHAA 3'
Onc2E1-PCR	5' AATGGCATTGTTGGIRIAA 3'
Onc2F1-PCR	5' AATGGCATTGTTGGGGTAA 3'
Onc2G1-PCR	5' AATGGCATTGTTGGGGAAA 3'
Onc2H1-PCR	5' AATGGCATTGTTGGCATAA 3'
Onc2I1-PCR	5' AATGGCATTGTTGGGGCAA 3'
Onc2J1-PCR	5' AATGGCATTGTTGGCACAA 3'
Onc2K2-PCR	5' TCATATTCCTCMICATGIC 3'
Onc2L2-PCR	5' TCATATTCCTCAACATGIC 3'
Onc2M2-PCR	5' TCATATTCCTCIICATGTC 3'
Onc2N2-PCR	5' TCATATTCCTCIICATGGC 3'
Onc2O2-PCR	5' TCATATTCCTCIICATGAC 3'
Onc2P2-PCR	5' TCATATTCCTCIICATGCC 3'

10

Las secuencias específicas del VPH en las SEQ ID NO: 149 y 150 (cebadores Onc2A2/Onc2A1-PCR y Onc2A1/Onc2A2-PCR) son idénticas a fragmentos de la secuencia genómica del VPH de tipo 16 desde la posición 6596 a la 6615 (SEQ ID NO: 149; Onc2A2/Onc2A1-PCR) y desde la posición 6729 a la 6747 (SEQ ID NO:150; Onc2A1/Onc2A2-PCR).

15

Las secuencias específicas del VPH SEQ ID NO: 152 y 153 (Onc2B2/Onc2B1-PCR y Onc2B1/Onc2B2-PCR) son variantes de las secuencias anteriores, respectivamente, que incluyen varias bases degeneradas. Las representaciones de las secuencias de moléculas de oligonucleótidos degenerados proporcionados en el presente documento utilizan el código convencional IUB para los sitios de bases mixtos: N=G, A, T, C; V=G, A, C; B=G, T, C; H=A, T, C; D=G, A, T; K=G, T; S=G, C; W=A, T; M=A, C; Y=C, T; R=A, G.

20

Es también posible utilizar variantes de las secuencias específicas del VPH SEQ ID NO: 152 (Onc2B2/Onc2B1-PCR) y SEQ ID NO: 153 (Onc2B1/Onc2B2-PCR) en las que cualquiera de dos de los nucleótidos "SRH" hacia el extremo 3' de la secuencia estén reemplazados por inosina (I), como se indica a continuación:

5' AATGGCATTGTGGTGGIIHAA 3'

5' AATGGCATTGTGGTGGSIHAA 3'

5 5' AATGGCATTGTGGTGGIRIAA 3'

Las secuencias específicas del VPH SEQ ID NO: 156-163 (presentes en los cebadores Onc2C2, Onc2D2, Onc2E2, Onc2F2, Onc2G2, Onc2H2, Onc2I2, Onc2J2, Onc2C1-PCR, Onc2D1-PCR, Onc2E1-PCR, Onc2F1-PCR, Onc2G1-PCR, Onc2H1-PCR, Onc2I1-PCR y Onc2J1-PCR) son variantes basadas en la secuencia específica del VPH SEQ ID NO: 152 (Onc2B2/Onc2B1-PCR), mientras que las secuencias específicas del VPH SEQ ID NO: 164-169 (presentes en los cebadores Onc2K1, Onc2L1, Onc2M1, Onc2N1, Onc2O1, Onc2P1, Onc2K2-PCR, Onc2L2-PCR, Onc2M2-PCR, Onc2N2-PCR, Onc2O2-PCR y Onc2P2-PCR) son variantes basadas en la secuencia específica del VPH SEQ ID NO: 153 (Onc2B1/Onc2B2-PCR). Estas variantes incluyen bases degeneradas y también residuos de inosina (I). Esta variación de secuencias permite que los oligonucleótidos que incorporan las secuencias variantes se unan a múltiples tipos de VPH. Las bases inosina no interfieren con la hibridación y por tanto pueden incluirse en los lugares de variación entre los tipos de VPH con el fin de construir un cebador "consenso" capaz de unirse a múltiples tipos de VPH.

Uno o más de los cebadores Onc2A2, Onc2B2, Onc2C2, Onc2D2, Onc2E2, Onc2F2, Onc2G2, Onc2H2, Onc2I2 y Onc2J2, pueden utilizarse en combinación con uno o más de los cebadores Onc2A1, Onc2B1, Onc2K1, Onc2L1, Onc2M1, Onc2N1, Onc2O1 y Onc2P1, para la amplificación mediante NASBA del ARNm de L1 del VPH.

Uno o más de los cebadores Onc2A1-PCR, Onc2B1-PCR, Onc2C1-PCR, Onc2D1-PCR, Onc2E1-PCR, Onc2F1-PCR, Onc2G1-PCR, Onc2H1-PCR, Onc2I1-PCR y Onc2J1-PCR, pueden utilizarse en combinación con uno o más de los cebadores Onc2A2-PCR, Onc2B2-PCR, Onc2K2-PCR, Onc2L2-PCR, Onc2M2-PCR, Onc2N2-PCR, Onc2O2-PCR y Onc2P2-PCR para la amplificación mediante PCR del ARNm de L1 del VPH.

La invención se comprenderá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos experimentales y figuras en las cuales:

la Figura 1A muestra los resultados de un ensayo de NASBA en tiempo real de una única reacción utilizando una sonda molecular fluorescente FAM para VPH 16 en una muestra de una paciente, mientras que la Figura 1B muestra un ensayo de NASBA en tiempo real múltiple (simultáneo) utilizando la sonda molecular fluorescente FAM de la Figura 1A y una sonda molecular fluorescente marcada con Rojo Texas para U1A, la Figura 2A muestra un NASBA en tiempo real de una sola reacción con la sonda molecular fluorescente FAM para VPH 18 en la muestra de una paciente, mientras que la Figura 2B muestra una versión múltiple (simultánea) con una sonda molecular fluorescente marcada con Rojo Texas para VPH 18 y una sonda molecular fluorescente marcada con FAM para VPH 33, la Figura 3A muestra un NASBA en tiempo real de una sola reacción con una sonda molecular fluorescente marcada con FAM para VPH 31, mientras que la Figura 3B muestra la versión múltiple (simultánea) incluyendo una sonda molecular fluorescente marcada con Rojo Texas para VPH 45, la Figura 4A muestra un NASBA en tiempo real de una sola reacción con una sonda molecular fluorescente marcada con FAM para VPH 33, mientras que la Figura 4B es una versión múltiple (simultánea) que incluye una sonda molecular fluorescente para VPH 18 marcada con Rojo Texas, la Figura 5A muestra un NASBA en tiempo real de una sola reacción con una sonda molecular fluorescente marcada con FAM para VPH 45, mientras que la Figura 5B muestra la versión múltiple (simultánea) que incluye una sonda molecular fluorescente marcada con Rojo Texas para VPH 45 y una sonda molecular fluorescente para VPH 31 marcada con FAM, y la Figura 6 muestra VPH detectado por PreTect VPH-Proofers y PCR en comparación con citología o histología.

#### Ejemplo 1 - Detección de ARNm de VPH mediante la amplificación de ácidos nucleicos basada en NASBA y detección en tiempo real

##### Recogida y preparación de muestras clínicas

Se recogieron frotis de Pap y muestras de VPH de 5970 mujeres en el programa de cribado de cuello uterino en Oslo, Noruega. Las muestras destinadas a la extracción de ARN/ADN se trataron como se indica a continuación:

Se recogieron muestras de cuello uterino de cada una de las mujeres asistentes al programa de cribado de cuello uterino utilizando un citocepillo (Rovers Medical Devices, Países Bajos). El citocepillo se sumergió posteriormente en 9 ml de tampón de lisis (tiocianato de guanidina 5 M). Como el ARN está mejor protegido en el tiocianato de guanidina 5 M a -70 °C, se utilizó únicamente 1 ml del volumen total de muestra para cada ciclo de extracción. Las muestras en tampón de lisis se almacenaron a -20 °C durante no más de una semana, posteriormente a -70 °C hasta el aislamiento de ADN/ARN.

El ARN y el ADN se aislaron automáticamente de 5300 mujeres en el primer ciclo de extracción, utilizando 1 ml de la muestra total de 9 ml en tampón de lisis. El ARN y el ADN se extrajeron de acuerdo con el método de aislamiento "Boom" de Organon Teknika (Organon Teknika B.V., Boselind 15, P.O. Box 84, 5280 AB Baxtel, Países Bajos; actualmente Biomérieux, 69280 Marcy l'Etoile, Francia) utilizando el extractor Nuclisens™ siguiendo el protocolo para extracción automatizada.

#### Estirpes celulares

Se utilizaron ADN y ARN de las estirpes celulares HeLa (VPH 18), SiHa (VPH 16) y CaSki (VPH 16) como controles positivos para las reacciones de PCR y NASBA. Estas células se utilizaron también como material de muestra en el estudio de sensibilidad (Ejemplo 2). Las células SiHa tienen 1-2 copias de VPH 16 integradas por célula, mientras que las células CaSki tienen entre 60-600 copias de VPH 16, integradas y en estado episómico. Las células HeLa tienen 10-50 copias de VPH 18 por célula aproximadamente.

#### Detección y tipificación del VPH mediante PCR

Se sometió ADN aislado de raspados de cuello uterino a PCR utilizando los cebadores consenso GP5+/6+ (EP-B-0 517 704). La PCR se realizó en un volumen de reacción de 50 µl que contenía Tris-HCl 75 mM (pH 8,8 a 25 °C), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, Tween 20™ 0,01 %, 200 mM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 1 U de ADN polimerasa Taq recombinante (MBI Fermentas), 3 µl de muestra de ADN y 50 pmoles de cada uno de los cebadores GP5+ y GP6+. A una etapa de desnaturalización de 2 minutos a 94 °C le siguieron 40 ciclos de amplificación con un procesador de PCR (Primus 96, HPL Block, MWG, Alemania). Cada ciclo incluía una etapa de desnaturalización de 1 minuto, una etapa de hibridación de los cebadores a 40 °C durante 2 minutos y una etapa de alargamiento de la cadena a 72 °C durante 1,5 minutos. La última etapa de alargamiento se prolongó en 4 minutos para asegurar una extensión completa del ADN amplificado.

Las muestras positivas con GP5+/6+ se sometieron a protocolos de PCR para el VPH de tipo 16, 31 y 33 como se indica a continuación:

VPH 16, 31 y 33: La PCR se realizó en 50 µl que contenían Tris-HCl 75 mM (pH 8,8 a 25 °C), 200 mM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 2,5 U de ADN polimerasa Taq recombinante (MBI Fermentas), 3 µl de muestra de ADN y 25 pmoles de cada cebador. A una etapa de desnaturalización de 2 minutos a 94 °C le siguieron 35 ciclos de amplificación con un procesador de PCR (Primus 96, HPL Block, MWG, Alemania). Cada ciclo incluía una etapa de desnaturalización de 30 segundos, una etapa de hibridación de los cebadores a 57 °C durante 30 segundos y una etapa de alargamiento de la cadena a 72 °C durante 1 minuto. La última etapa de alargamiento se prolongó en 10 minutos para asegurar una extensión completa del ADN amplificado. El protocolo para VPH 33 tenía una etapa de hibridación de los cebadores a 52 °C. Protocolo para el VPH 18: Se diseñaron cebadores para identificar VPH de tipo 18. La PCR se realizó en 50 µl que contenían Tris-HCl 75 mM (pH 8,8 a 25 °C), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, Tween 20 0,01 %, 200 mM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM, 2,5 U de ADN polimerasa Taq recombinante (MBI Fermentas), 3 µl de muestra de ADN y 25 pmoles de cada cebador. A una etapa de desnaturalización de 2 minutos a 94 °C le siguieron 35 ciclos de amplificación en un procesador de PCR (Primus 96, HPL Block, MWG, Alemania). Cada ciclo incluía una etapa de desnaturalización de 30 segundos, una etapa de hibridación de los cebadores a 57 °C durante 30 segundos y una etapa de alargamiento de la cadena a 72 °C durante 1 minuto. La última etapa de alargamiento se prolongó en 10 minutos para asegurar una extensión completa del ADN amplificado.

Se utilizó un conjunto de cebadores dirigidos contra el gen de la β-globina humana como control de calidad del ADN (Procedimiento de trabajo, University Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam, Países Bajos). La PCR se realizó en 50 µl que contenían Tris-HCl 75 mM (pH 8,8 a 25 °C), 200 mM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 1 U de ADN polimerasa Taq recombinante (MBI Fermentas), 3 µl de muestra de ADN y 25 pmoles de cada cebador. A una etapa de desnaturalización de 2 minutos a 94 °C le siguieron 35 ciclos de amplificación en un procesador de PCR (Primus 96, HPL Block, MWG, Alemania). Cada ciclo incluía una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, una etapa de hibridación de los cebadores a 55 °C durante 1 ½ minutos y una etapa de alargamiento de la cadena a 72 °C durante 2 minutos. La última etapa de alargamiento se prolongó en 4 minutos para asegurar una extensión completa del ADN amplificado. Se utilizó HeLa como control positivo para VPH 18, mientras que se utilizaron SiHa o CaSki como control positivo para VPH 16. Se utilizó agua como control negativo. Cebadores utilizados para la PCR del VPH:

Tipo	Cebador	Secuencia de los cebadores	Posición	Longitud (pb)
VPH 16	Pr1	5' TCA AAA GCC ACT GTG TCC TGA 3'	421 - 440	119
	Pr2	5' CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA 3'	521 - 540	
VPH 18	Pr1	(5' TTC CGG TTG ACC TTC TAT GT 3')	651 - 670	186
	Pr2	(5' GGT CGT CTG CTG AGC TTT CT 3')	817 - 836	
VPH 31	Pr1	5' CTA CAG TAA GCA TTG TGC TAT GC 3'	3835 - 3875	153
	Pr2	5' ACG TAA TGG AGA GGT TGC AAT AAC CC 3'	3963 - 3988	

Tipo	Cebador	Secuencia de los cebadores	Posición	Longitud (pb)
VPH 33	Pr1	5' AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG 3'	567 - 587	211
	Pr2	5' ACA CAT AAA CGA ACT GTG TGT 3'	758 - 778	
Gp+	Gp5+	5' TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC 3'	6624 - 6649	150
	Gp6+	5' GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	6719 - 6746	
BGPCO3	Pr1	5' ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC		
BGPCO5	Pr2	5' GAA ACC CAA GAG TCT TCT CT		

La visualización de los productos de la PCR se realizó en un chip de ADN 500 (Agilent Technologies, EE.UU.) según su manual. El chip de ADN utiliza electroforesis en gel a microescala con un límite de detección óptimo de 0,5-50 ng/ml. Los resultados se interpretaron utilizando el programa de ordenador Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, EE.UU.).

La tabla siguiente confirma los cebadores utilizados para la PCR del VPH en muestras de pacientes e indica cebadores de PCR adicionales útiles para VPH 35, 39, 45, 51, 52, 58 y VPH 6/11.

Cebadores de PCR para la detección de VPH.

Tipo	Cebador	Secuencia de los cebadores	Posición	Longitud (pb)
VPH 6/11	Pr1	5' TAC ACT GCT GGA CAA CAT 3'	514 - 531	123
	Pr2	5' TCA TCT TCT GAG CTG TCT 3'	619 - 636	
VPH 16	Pr1	5' TCA AAA GCC ACT GTG TCC TGA 3'	421 - 441	120
	Pr2	5' CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA 3'	520 - 540	
VPH 18	Pr1	5' TTC CGG TTG ACC TTC TAT GT 3'	651 - 670	186
	Pr2	5' GGT CGT CTG CTG AGC TTT CT 3'	817 - 836	
VPH 31	Pr1	5' CTA CAG TAA GCA TTG TGC TAT GC 3'	3835 - 3857	155
	Pr2	5' ACG TAA TGG AGA GGT TGC AAT AAC CC 3'	3964 - 3989	
VPH 33	Pr1	5' AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG 3'	567 - 587	212
	Pr2	5' ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG 3'	758 - 778	
VPH 35	Pr1	5' CCC GAG GCA ACT GAC CTA TA 3'	610 - 629	231
	Pr2	5' GGG GCA CAC TAT TCC AA ATG 3'	821 - 840	
VPH 39	Pr1	5' GCA GAC GAC CAC TAC AGC AAA 3'	210 - 230	153
	Pr2	5' ACA CCG AGT CCG AGT AAT A 3'	344 - 362	
VPH 45	Pr1	5' GAA ACC ATT GAA CCC AGC AGA AAA 3'	428 - 451	154
	Pr2	5' TTG CTA TAC TTG TGT TTC CCT ACG 3'	558 - 581	
VPH 51	Pr1	5' GGA GGA GGA TGA AGT AGA TA 3'	658 - 677	169
	Pr2	5' GCC CAT TAA CAT CTG CTG TA 3'	807 - 826	
VPH 52	Pr1	5' GTG CCT ACG CTT TTT ATC TA 3'	296 - 315	233
	Pr2	5' GGG GTC TCC AAC ACT CTG AAC A 3'	507 - 528	
VPH 58	Pr1	5' TCA GGC GTT GGA GAC ATC 3'	157 - 174	162
	Pr2	5' AGC AAT CGT AAG CAC ACT 3'	301 - 318	
Gp+	Gp5+	5' TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC 3'		150
	Gp6+	5' GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C		
BGPCO3	Pr1	5' ACA CAA CTG TGT TCA CAT GC		
BGPCO5	Pr2	5' GAA ACC CAA GAG TCT TCT CT		

#### Amplificación de ARN mediante NASBA

Precauciones para evitar contaminación:

1. Realizar la liberación, el aislamiento y la amplificación/detección de los ácidos nucleicos en áreas del laboratorio separadas.
2. Almacenar y preparar los reactivos para la liberación, el aislamiento y la amplificación/detección de los ácidos nucleicos en las áreas del laboratorio en las que vayan a realizarse la liberación, el aislamiento y la amplificación/detección de los ácidos nucleicos, respectivamente.
3. Mantener todos los tubos y viales cerrados cuando no se estén utilizando.
4. Las pipetas y cualquier otro equipamiento que se hayan utilizado en un área del laboratorio no deben ser utilizados en las demás áreas.
5. Utilizar una pipeta o una punta de pipeta nueva para cada pipeteo.
6. Utilizar pipetas con puntas resistentes a aerosoles para los fluidos que es posible que contengan ácido nucleico. El pipeteo de las soluciones debe realizarse siempre fuera o dentro de un tubo aislado que se abra y cierre exclusivamente para esta acción. Todos los demás tubos y viales deben mantenerse cerrados y separados del que se está manejando.
7. Utilizar guantes desechables cuando se trabaje con material clínico que es posible que contenga ARN diana o

material amplificado. Si es posible, cambiar los guantes después de cada etapa de pipeteo en el procedimiento de ensayo, especialmente después de entrar en contacto con material posiblemente contaminado.

8. Recoger el material desechable utilizado en un recipiente. Cerrar y retirar el recipiente después de cada ensayo.

5 9. Sumergir las gradillas de los tubos utilizadas durante el aislamiento o la amplificación/detección del ácido nucleico en un detergente (por ejemplo, Extran MA01 alcalino de Merck) durante al menos una hora después de cada ensayo.

10 El procedimiento siguiente se realizó utilizando los reactivos del kit Nuclisens™ Basic Kit, suministrado por Organon Teknika.

Procedimiento para n=10 muestras:

15 1. Preparar la solución enzimática.

Añadir 55 µl de diluyente enzimático (del Nuclisens™ Basic Kit; contiene sorbitol en solución acuosa) a cada una de tres esferas enzimáticas liofilizadas (del Nuclisens™ Basic Kit; contiene AMV-RT, ARNasa H, ARN polimerasa de T7 y BSA). Dejar esta solución enzimática al menos durante 20 minutos a temperatura ambiente. Juntar las soluciones enzimáticas en un tubo, mezclar bien golpeando el tubo con los dedos, agitar con formación de vórtice brevemente y utilizar en 1 hora. Las concentraciones finales en la mezcla enzimática son sorbitol 375 mM, 2,5 µg de BSA, 0,08 U de ARNasa H, 32 U de ARN polimerasa de T7 y 6,4 U de transcriptasa inversa de AMV.

2. Preparar la solución de esferas reactivas/KCl.

25 Para 10 muestras: añadir 80 µl del diluyente para las esferas reactivas (procedente del Nuclisens™ Basic Kit; contiene Tris/HCl (pH 8,5), 45 % de DMSO) a la esfera reactiva liofilizada (procedente del Nuclisens™ Basic Kit; contiene nucleótidos, ditiotreitól y MgCl<sub>2</sub>) e inmediatamente agitar bien con formación de vórtice. Hacer esto con 3 esferas reactivas y mezclar las soluciones en un tubo.

30 Añadir 3 µl de agua para NASBA (procedente del Nuclisens™ Basic Kit) a la solución de esferas reactivas reconstituidas y mezclar bien.

35 Añadir 56 µl de solución madre de KCl (procedente del Nuclisens™ Basic Kit) y mezclar bien. La utilización de esta mezcla KCl/agua tendrá como resultado reacciones de NASBA con una concentración final de KCl de 70 mM. Las concentraciones finales en la solución reactivo/KCl son 1 mM de cada dNTP, 2 mM de ATP, UTP y CTP, GTP 1,5 mM y ITP 0,5 mM, ditiotreitól 0,5 mM, KCl 70 mM, MgCl<sub>2</sub> 12 mM, Tris-HCl 40 mM (pH 8,5).

40 3. Preparar una solución de cebadores/sondas que contenga cebadores específicos de la diana y una sonda molecular fluorescente (baliza).

45 Para cada reacción de la diana transferir 91 µl de la solución de esferas reactivas/KCl (preparada en la etapa 2) a un tubo nuevo. Añadir 25 µl de la solución de cebadores/sonda molecular fluorescente (para proporcionar una concentración final de ~0,1-0,5 µM de cada uno de los cebadores codificantes y no codificantes y ~15-70 pmoles de la sonda molecular fluorescente por reacción). Mezclar bien con formación de vórtice. No centrifugar.

50 En el caso de que se vayan a realizar menos de 10 amplificaciones del ARN diana, referirse a la tabla siguiente para obtener las cantidades apropiadas de la solución de esferas reactivas, de la solución de KCl/agua y de los cebadores que se han de utilizar. Las soluciones de los cebadores deben utilizarse en los 30 minutos siguientes a su preparación.

Reacciones (n)	Solución de esferas reactivas (µl)	KCl/agua (µl)	Mezcla de cebadores (µl)
10	80	30	10
9	72	27	9
8	64	24	8
7	56	21	7
6	48	18	6
5	40	15	5
4	32	12	4
3	24	9	3
2	16	6	2
1	8	3	1

4. Adición de las muestras.

Para cada reacción de ARN diana:

- 5 En una placa de microvaloración de 96 pocillos pipetear 10 µl de la solución de cebadores/sonda (preparada en la etapa 3) en cada uno de 10 pocillos. Añadir 5 µl de extracto de ácido nucleico a cada pocillo. Incubar la placa de microvaloración durante 4 minutos a 65 ± 1 °C. Enfriar a 41 ± 0,5 °C durante 4 minutos. Añadir posteriormente a cada pocillo 5 µl de solución enzimática. Colocar inmediatamente la placa de microvaloración en un instrumento de detección de fluorescencia (por ejemplo, NucliSens™ EasyQ Analyzer) y comenzar la amplificación.

10

Resultados de un estudio clínico

15 La Tabla 7 muestra la distribución de casos positivos para VPH (expresión de L1 y/o E6) mediante NASBA en tiempo real y de casos positivos para VPH mediante PCR relacionados con los resultados de la citología. La amplificación mediante PCR se realizó según se describe por Karlsen y col., *J. Clin. Microbiol.*, 34: 2095-2100, 1996. Los números para la histología esperada se basan en los resultados medios de un estudio similar en lesiones CIN III (Clavel y col., *Br. J. Cancer*, 84: 1616-1623, 2001). Los resultados de varios casos ejemplares se enumeran en la Tabla 8.

20

Tabla 7:

	Normal	Benigno	Condiloma	CIN III
<b>Citología</b>	4474	66	16	15
<b>PCR</b>	9,0 %	44,6 %	87,5 %	73,3 %
<b>NASBA en tiempo real</b>	1 %	24,6 %	37,5 %	73,3 %
<b>Histología Esperada</b>	0,2 %	5-15 %	15-20 %	71 %

Tabla 8:

N.º Interno	Citología	PCR	NASBA de L1	NASBA de E6
84	Neg	Neg	Neg	31
289	Neg	31	Pos	31
926	Neg	Neg	Pos	16
743	Benigna	Neg	Neg	33
1512	Benigna	16	Pos	16
3437	Benigna	Neg	Neg	18
3696	Benigna	16	Pos	Neg
2043	Condiloma	16, 51	Pos	16
3873	Condiloma	16, 51	Pos	16
3634	CIN II	33	Neg	33
4276	CIN III	Neg	Neg	18
4767	CIN III	18	Neg	18
1482	CIN III	Neg	Pos	16
5217	CIN III	31	Neg	31
4696	CIN III	Neg	Neg	Neg

25

Ejemplo 2 - Sensibilidad del NASBA en tiempo real en estirpes celulares control

30 Se diluyeron estirpes celulares de cáncer de cuello uterino CaSki, SiHa y HeLa en tampón de lisis antes de la extracción automatizada de ácidos nucleicos utilizando el método de extracción Boom de Organon Teknika/bioMerieux (paralelos 1 y 3), o después de la extracción de los ácidos nucleicos (paralelo 2). El NASBA en tiempo real se realizó utilizando sondas moleculares fluorescentes ("balizas") marcadas con Rojo Texas (16, L1 y 18) o FAM (U1A, 33 y 31) siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

Tabla 9:

	CaSki				CaSki				HeLa								
	16 E6	U1	16 E6	U1	16 E6	U1	L1	33 E6	L1	33 E6	18 E6	31 E6	18 E6	31 E6			
Conjuntos de cebadores y sondas	1	1	3	3	1	1	1	1	2	2	3	1	1	2	2	3	3
Paralelos																	
Número de células																	
	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
100.000	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
10.000	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
1.000	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
100	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Por tanto, es posible detectar ARNm de E6 de VPH en menos de 1 célula utilizando NASBA en tiempo real.

El NASBA en tiempo real se sometió a ensayo como un ensayo múltiple simultáneo y como reacciones individuales. Los resultados del siguiente estudio de sensibilidad se basan en procesos simultáneos de las estirpes celulares CaSki, SiHa y HeLa, y en tres procesos simultáneos en oligos de ADN sintéticos para VPH de tipo 16, 18, 31 y 33. La definición del límite de detección es que las dos muestras del paralelo sean positivas. El número entre paréntesis (x) indica que la cantidad especificada de células también se ha detectado en algunos procesos. Se define sensibilidad como la cantidad de células necesaria para la detección de VPH en dos procesos simultáneos. Los tipos de VPH se determinan a partir de la PCR y la especificidad está basada en el NASBA en comparación con la PCR.

Sensibilidad

PCR: La PCR consenso para VPH utilizando Gp5+/6+ detectó únicamente hasta 10<sup>4</sup> células SiHa y HeLa, y hasta 10<sup>3</sup> células CaSki. Sin embargo, los conjuntos de cebadores de PCR específicos de tipo fueron más sensibles, detectando 10<sup>3</sup> (10<sup>2</sup>) células SiHa y 0,1 células CaSki para el conjunto de cebadores de PCR específicos de VPH de tipo 16, mientras que el conjunto de cebadores de PCR específicos para VPH de tipo 18 detectó 10<sup>2</sup> células HeLa.

NASBA en tiempo real: El NASBA en tiempo real con cebadores específicos para U1A, detectó 10 (1) células SiHa y CaSki y 1 célula HeLa en la mezcla de reacción. Para los cebadores específicos de VPH 16, el límite de detección inferior fue de 10 (10<sup>2</sup>, 1) células SiHa y 10 (1) células CaSki y para los cebadores específicos de VPH 18 el límite de detección fue de 1 (0,1) célula HeLa. Los cebadores universales de L1 detectaron 10 células CaSki. Las células HeLa y las células SiHa no fueron detectadas con los cebadores universales de L1.

El NASBA múltiple simultáneo en tiempo real con los cebadores específicos de U1A, tuvo un límite de detección inferior de 10<sup>2</sup> (10) células SiHa y 10 (1) células CaSki cuando se combinaron con los cebadores específicos de VPH 16, que tuvieron un límite de detección inferior de 10 (1) células SiHa y 10 (1) células CaSki. Los cebadores específicos de L1 en combinación con los cebadores específicos de VPH 33 detectaron 10<sup>3</sup> (10<sup>2</sup>) células CaSki. No había ninguna muestra de VPH 33 competidora en la reacción. Para los cebadores específicos de VPH 18, el límite de detección inferior fue de 1 (0,1) célula HeLa cuando se combinaron con los cebadores específicos de VPH 31. No había ninguna muestra de VPH 31 competidora en la reacción. La sensibilidad de los cebadores específicos de VPH 31 y VPH 33 no se analizó, debido a la falta de estirpes celulares que albergaran estos tipos de VPH. Se sometieron a ensayo frente a muestras que contenían VPH 31 y VPH 33, pero no se conocía la cantidad de células ni el número de copias de VPH 31 y VPH 33 en estas células y muy probablemente variaba en las diferentes muestras.

Tabla 10: Sensibilidad del NASBA en tiempo real en comparación con la PCR

Cebador	NASBA			PCR		
	SiHa	CaSki	HeLa	SiHa	CaSki	HeLa
Gp5/6+	-	-	-	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
L1	-	10 <sup>3</sup> (10 <sup>2</sup> )	-	-	-	-
U1A	10 <sup>2</sup> (10)	10 (1)	-	-	-	-
VPH 16	10 (1)	10	-	10 <sup>3</sup> (10 <sup>2</sup> )	0,1	-
VPH 18	-	-	10 (0,1)	-	-	10 <sup>2</sup>

El NASBA en tiempo real se realizó en muestras procedentes de mujeres admitidas en el Østfold Central Hospital para el tratamiento de CIN en el periodo de 1999-2001 (véase el Ejemplo 3). Se utilizaron sondas moleculares fluorescentes marcadas con FAM o Rojo Texas junto con los protocolos de extracción de ácidos nucleicos y de NASBA descritos anteriormente. Los resultados se muestran en las Figuras 1A y 1B (VPH 16 - muestra de la paciente 205), en las Figuras 2A y 2B (VPH 18 - muestra de la paciente 146), en las Figuras 3A y 3B (VPH 31 - muestra de la paciente 236), en las Figuras 4A y 4B (VPH 33 - muestra de la paciente 218) y en las Figuras 5A y 5B (VPH 45 - muestra de la paciente 343). En cada caso, la Figura "A" es una única reacción mientras que la Figura "B" es el ensayo múltiple simultáneo.

Especificidad: Reactividad cruzada del NASBA en tiempo real. Se sometieron a ensayo combinaciones de cebadores de NASBA en tiempo real frente a 490 muestras de cuello uterino procedentes del estudio de Oslo positivas con PCR para VPH 6/11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58 o para VPH X con el fin de comprobar la reactividad cruzada entre los tipos de VPH utilizando NASBA. Todas las muestras habían sido tipificadas mediante PCR consenso y mediante PCR específica de tipo para los tipos respectivos de VPH, excepto para VPH de tipo 39 (2), 52 (1) y 58 (2). Estas muestras se añaden para el análisis frente a PreTect VPH-Proofer. VPH X son positivas para la PCR consenso con Gp5+/6+ pero negativas para VPH 6/11, 16, 18, 31, 33, 35, 45 y 51 mediante PCR específica de tipo. Los resultados se muestran en la Tabla 14. No se demostró reactividad cruzada. La confirmación de la secuencia de un número seleccionado de casos de la Tabla 14 se muestra en la Tabla 14a.

PCR: Se analizaron un total de 773 muestras de cuello uterino con PCR y con PreTect VPH-Proofer (NASBA múltiple simultáneo en tiempo real), y un total de 24,6 % (190/773) muestras fueron positivas con los cebadores de PCR consenso Gp5+/6+. El 74,1 % (83/112) fueron tipificadas como VPH 16, el 13 % (15/112) VPH 18, el 17 %

(19/112) VPH 31 y el 12 % (13/112) VPH 33 incluyendo infecciones por múltiples VPH. Un total de 103 muestras tenían infecciones por un único VPH o por múltiples VPH, y el 91,3 % (94/103) tenían únicamente infección por un solo VPH. Las infecciones por dos VPH tenían lugar en el 8,7 % (9/103) de las muestras. Todas las muestras se analizaron en primer lugar con los cebadores de PCR consenso Gp5+/6+. Las muestras negativas en la PCR para VPH procedentes de la PCR consenso con Gp5+/6+ se analizaron posteriormente con los cebadores control de β-globina para la verificación de ADN intacto. Las muestras positivas en la PCR para VPH no se sometieron a este control de ADN. Las muestras negativas para VPH en este estudio fueron todas positivas con los cebadores de PCR de β-globina control. Únicamente las muestras de ADN positivas en la PCR con Gp5+/6+ se sometieron a una PCR específica de tipo. Los tipos de VPH de interés fueron VPH 16, 18, 31 y 33.

NASBA múltiple simultáneo en tiempo real: Para las reacciones de NASBA en tiempo real, se utilizaron los cebadores y sondas para el producto del gen U1A como control de funcionamiento para ARN intacto. Las muestras negativas para U1A se rechazaron.

Un total de 14,2 % (110/773) de las muestras fueron positivas con al menos uno de los cebadores de NASBA específicos para un tipo de VPH incluyendo las muestras que presentaban infecciones por múltiples VPH. De estas muestras, el 54,5 % (60/110) fueron positivas con los cebadores de NASBA para VPH 16, el 13,6 % (15/110) con los cebadores para VPH 18, el 21,8 % (24/110) con los cebadores para VPH 31 y el 13,6 % (15/110) con los cebadores para VPH 33. Un total de 45 muestras fueron positivas con los cebadores consenso para L1 y normalmente junto con la expresión de los oncogenes E6/E7 del VPH 16 82,2 % (13/45). El L1 consenso fue detectado en el 2,2 % (1/45) junto con VPH 18, 31 y 33, respectivamente. L1 también se detectó solo en el 8,9 % (4/45) de los casos, y todos fueron positivos en la PCR con los cebadores Gp5+/6+. Un total de 108 muestras tenían infecciones por un único VPH o por múltiples VPH, y el 98,1 % (106/108) tenían únicamente infecciones por un solo VPH. La doble expresión de ARNm tuvo lugar en el 1,9 % (2/108) de las muestras.

NASBA múltiple simultáneo en tiempo real comparado con la PCR: Un total de 87 muestras mostró la presencia de ADN o ARN de VPH 16 con PCR para VPH 16 o con PreTect VPH-Proofer. Se determinó que el 64,4 % (56/87) eran positivas para VPH 16 con PCR y con NASBA en tiempo real. El 39,1 % (34/87) eran solo positivas con PCR y el 3,4 % (3/87) eran solo positivas con NASBA en tiempo real. Para VPH 18, un total de 20 muestras mostraron la presencia de ADN o ARN de VPH 18 con PCR o con NASBA en tiempo real. De estas 20 muestras, el 50 % (10/20) fueron positivas con ambos ensayos y el 35 % (7/20) fueron positivas únicamente con PCR y el 15 % (3/20) fueron solo positivas con NASBA en tiempo real. Un total de 27 muestras mostraron la presencia de ADN o ARN de VPH 31 con PCR o NASBA en tiempo real. De estas 27 muestras, el 59,3 % (16/27) fueron positivas con ambos ensayos y el 11,1 % (3/27) fueron positivas únicamente con el ensayo de PCR y el 18,5 % (5/27) fueron únicamente positivas con el ensayo de NASBA en tiempo real. Para VPH 33, un total de 18 muestras mostraron la presencia de ADN o ARN de VPH con PCR o con PreTect VPH-Proofer, y el 55,6 % (10/18) de las muestras dieron positivo con ambos ensayos. El 16,7 % (3/18) fueron únicamente positivas con PCR y el 22,2 % (4/18) fueron únicamente positivas con el NASBA en tiempo real.

Tabla 11: Distribución estadística de VPH en las muestras con PCR y con NASBA en tiempo real.

	PCR	%	NASBA	%
<b>Muestras totales</b>	<b>773</b>		<b>773</b>	
<b>Muestras positivas totales</b>	190	24,6	110	14,2
<b>VPH 16</b>	83	74,1	60	54,5
<b>VPH 18</b>	15	13	15	13,6
<b>VPH 31</b>	19	17	24	21,8
<b>VPH 33</b>	13	12	15	13,6
<b>VPH X</b>	78	69,6	-	-

Tabla 12: Correspondencia entre PCR y NASBA en tiempo real

	Total	Ambos Ensayos	%	Solo PCR+	% (PCR)	% (Total)	Sólo NASBA+	% (NASBA)	% (Total)
<b>VPH 16</b>	87	56	64,4	34	41,0	39,1	3	5	3,4
<b>VPH 18</b>	20	10	50,0	7	46,7	35,0	3	20	15,0
<b>VPH 31</b>	27	16	59,3	3	15,8	11,1	5	20,8	18,5
<b>VPH 33</b>	18	10	55,6	3	23,1	16,7	4	26,7	22,2

Tabla 13: Resultados del NASBA en tiempo real para L1

	Total	%
<b>L1 (NASBA)</b>	45	100
<b>L1 + VPH 16</b>	37	82,2
<b>L1 solo</b>	4	8,9
<b>L1 + VPH 18</b>	1	2,2
<b>L1 + VPH 31</b>	1	2,2
<b>L1 + VPH 33</b>	1	2,2

Tabla 14: Especificidad genética del NASBA múltiple simultáneo en tiempo real en comparación con la PCR

Cebadores NASBA	VPH (PCR)											Número total	
	6/11	16	18	31	33	35	39	45	51	52	58		X
<b>16</b>	2	28	1	0	1	1	0	0	5	0	0	2	
<b>18</b>	1	1	18	0	1	0	0	0	1	0	0	1	
<b>31</b>	1	0	1	13	1	5	0	1	1	0	0	0	
<b>33</b>	1	2	0	2	12	2	0	1	2	0	0	1	
<b>45</b>	2	1	1	1	1	1	0	17	1	0	0	1	
<b>Suma analizada</b>	43	71	36	32	25	23	2	23	31	1	2	201	<b>490</b>

Tabla 14a: Secuenciación del ADN a partir de los cebadores de PCR Gp5+ (no será incluido en el artículo)

N.º Int	Tipo de VPH por PCR	Tipo de VPH por PreTect VPH-Proofer	Tipo de VPH por secuenciación (BLAST)
1272	16	16	16
152	35		35
2655	58		58
2924	33	33	33
2942	18	18	18
2987	16	16	16
3016	33	33	33
3041	35		35
3393	35		35
3873	16	16	16
4767	18	18	18
5707	18	18	18
845	X		39

5 Análisis

La sensibilidad del NASBA en tiempo real fue en general mejor que la sensibilidad de la PCR. La sensibilidad general del NASBA en tiempo real para todos los marcadores estaba entre 1 y 10<sup>2</sup> células, la cual es considerablemente mejor que para la reacción de PCR con un intervalo de sensibilidad de 10<sup>2</sup> a 10<sup>4</sup>. Según se esperaba, la sensibilidad de los cebadores y sondas específicos era mejor que la sensibilidad de los cebadores y sondas universales. El NASBA en tiempo real era tan sensible o más sensible que el NASBA múltiple simultáneo en tiempo real.

Se utilizaron cebadores de NASBA en tiempo real y la sonda molecular fluorescente dirigida hacia U1A (un gen constitutivo humano) como control de funcionamiento del material de muestra en la reacción de NASBA en tiempo real con el fin de asegurar que el ARN del material de la muestra estaba intacto. Una señal positiva procedente de esta reacción era necesaria para la validación de la reacción de NASBA en tiempo real.

La sensibilidad del NASBA en tiempo real universal con L1 (la principal proteína de la cápside de VPH) era mucho mejor que para la PCR con Gp5+/6+ universal, dirigida también contra L1, con una sensibilidad de 10 células en comparación con 10<sup>3</sup> (10<sup>2</sup>) células CaSki. Estos dos conjuntos de cebadores (PCR y NASBA) tenían sus dianas en la misma región del gen L1 conservado de diferentes tipos de VPH. Las diferencias en sensibilidad pueden deberse al hecho de que hay normalmente una copia de cada gen por célula, mientras que el número de copias de ARNm puede ser de varios cientos. Los cebadores de L1 del NASBA en tiempo real no detectaron células SiHa ni HeLa como lo hicieron los cebadores de PCR Gp5+/6+, indicando la ausencia de expresión de L1 en estas estirpes celulares. Los cebadores de PCR Gp5+/6+ detectaron 10<sup>4</sup> células SiHa o HeLa. Considerando la cantidad de copias de VPH en cada célula, tiene sentido el que se detectaran células CaSki en 1/10 de la cantidad de células SiHa y HeLa, ya que las células CaSki tienen 60-600 copias de VPH por célula, integradas y episómicas, mientras que las células SiHa tienen 1-2 copias de VPH integradas por célula y las células HeLa tienen 10-50 copias de VPH integradas por célula. El conjunto de cebadores para L1 detectó únicamente células CaSki, con las formas integradas y episómicas de VPH, y no células SiHa ni HeLa, únicamente con formas integradas de VPH. Esto podría indicar que el gen L1 es el único expresado en los estados episómicos de la infección por VPH, y por tanto L1 puede ser un marcador valioso de la integración y la persistencia de la infección por VPH.

Los cebadores de NASBA específicos para un tipo de VPH se dirigen contra el transcrito de E6/E7 de longitud completa, que se expresa en gran cantidad en las células cancerosas debido a la ausencia del producto del gen E2. Los 16 cebadores específicos de tipo del NASBA en tiempo real detectaron 10 (1) células SiHa y 10 (1) células CaSki, en comparación con los cebadores de PCR para VPH 16 que detectaron 10<sup>3</sup> (10<sup>2</sup>) células SiHa. La explicación de esto podría ser la diferente cantidad de copias de VPH en cada estirpe celular. Las células CaSki tienen formas integradas y formas episómicas de VPH, mientras que SiHa tiene únicamente formas integradas del VPH. Esto puede deberse a la elevada expresión de ARNm de los genes E6/E7. Para la detección de células CaSki,

el límite de detección para los cebadores del NASBA para VPH 16 era de 10 (1) células CaSki en comparación con 0,1 células CaSki para los cebadores de PCR de VPH 16. Esto es peculiar, pero una explicación puede ser que las células CaSki contienen de 60-600 copias de ADN de VPH 16, por lo que es posible detectar 0,1 células CaSki con 6-60 copias de ADN de VPH 16. La menor sensibilidad del NASBA en tiempo real en comparación con la PCR, puede indicar que la expresión de E6/E7 en las células CaSki es moderada/baja. La degradación del ARNm inestable puede ser también una explicación. La cantidad de copias de VPH en las células CaSki puede ser del orden de 60-600 veces mayor que en las células SiHa, lo cual está mostrado por la detección más sensible de células CaSki.

Los cebadores de PCR específicos de tipo para VPH 18 detectaron  $10^2$  células HeLa. Esta es una magnitud 100 veces mejor que la de los cebadores Gp5+/6+ consenso para VPH e indica que los cebadores específicos son en general más sensibles que los cebadores consenso. La sensibilidad de los cebadores de NASBA específicos de tipo para VPH 18 fue de 1 (0,1) células HeLa, indicando una elevada expresión de E6/E7 en las células HeLa.

La sensibilidad de los cebadores de NASBA para U1A fue de 10 células SiHa o CaSki. La diana para el conjunto de cebadores de U1A es un gen constitutivo humano que se expresa en todas las células humanas.

La sensibilidad de la PCR y del NASBA varía para los diferentes conjuntos de cebadores y materiales de muestra, y en general los cebadores específicos de tipo son más sensibles que los cebadores consenso debido al desacoplamiento de pares de bases en los conjuntos de cebadores consenso. La temperatura de hibridación para los cebadores en la reacción de PCR puede ser optimizada, proporcionando condiciones de reacción óptimas para los cebadores. En contraste con la temperatura de hibridación en la PCR, la temperatura de hibridación para los cebadores del NASBA debe ser fijada a 41 °C. Esta falta de flexibilidad de la temperatura puede hacer que los cebadores del NASBA sean menos sensibles y menos específicos que los cebadores de PCR.

La PCR amplifica ADN bicatenario y la diana está normalmente presente como una copia por célula, y esto la hace vulnerable al número de células en el material de muestra. La diana para la reacción de NASBA es ARN, y el ARNm puede estar presente como múltiples copias por célula, dependiendo de la expresión de los genes. Eligiendo un gen que se exprese mucho, el número de copias de ARNm puede ser de varios cientos por célula y por tanto más fácil de detectar.

El ADNbc es relativamente estable en la célula y el material permanece intacto durante mucho tiempo. En contraste con el ADNbc, el ARNm no es en general muy estable y la degradación del ARNm es rápida, dependiendo de la célula. No se detecta actividad ADNasa o ARNasa en el tampón de lisis, por lo que el ADNbc y el ARNm deben ser estables. La actividad autocatalítica puede degradar el ADN y el ARN. El ADN/ARN de la muestra de cuello uterino debe permanecer intacto cuando se almacena en el tampón de lisis durante 24 horas a 15-30 °C, durante 7 días a 2-8 °C o a -70 °C para un almacenamiento de larga duración.

Una limitación de la reacción de NASBA en tiempo real es la concentración de las sondas moleculares fluorescentes ("balizas"). La cantidad de los productos superará a la concentración de las sondas moleculares fluorescentes y por tanto no se detectará debido a que una elevada concentración de las sondas moleculares fluorescente hará que la mezcla de reacción sea más compleja e inhibirá la reacción de amplificación. Los nucleótidos pueden ser también una limitación para la cantidad final del producto de amplificación, tanto en la reacción de PCR como en la reacción del NASBA. La concentración final del producto amplificado puede inhibir por sí misma la amplificación posterior debido a la cantidad de producto y a la complejidad de la mezcla de reacción. Durante una reacción de NASBA en presencia de sondas moleculares fluorescentes, la sonda podría competir con la amplificación hibridándose al molde, haciendo que el mismo no esté disponible para la síntesis de ARN posterior. De esta forma, el ARN es eliminado como sustrato para las etapas de transcripción inversa y para la síntesis posterior de ARN mediante la ARN polimerasa de T7. Esta competición no es significativa con pequeñas cantidades de sonda molecular fluorescente, y con una elevada cantidad de sonda molecular fluorescente esta inhibición puede ser superada por un número mayor de copias del ARN inicial.

La relación lineal entre la cantidad de ARN inicial y el tiempo hasta obtener una señal positiva se analizó en diluciones seriadas de 10 veces de diferentes estirpes celulares con VPH. Existía una clara indicación de que una señal positiva era dependiente de la cantidad de ARN inicial y del tiempo. La reacción múltiple simultánea necesitaba más tiempo que la reacción única para mostrar una señal positiva. Esto podría deberse a una competición en la mezcla más compleja en el recipiente de la reacción múltiple y también al hecho de que la reacción múltiple tiene una concentración diferente y menor de cebador y sonda. La relación entre la cantidad de ARN diana y el tiempo hasta obtener una señal positiva revela la posibilidad de una reacción de amplificación cuantitativa múltiple simultánea en tiempo real con patrones internos de ARN en cada recipiente de reacción.

NASBA en tiempo real: individual frente a múltiple. El NASBA en tiempo real era en general más sensible que el NASBA múltiple simultáneo en tiempo real. Esto era según se esperaba debido a la competición entre los cebadores y sondas en la reacción múltiple simultánea. La concentración final de cebadores y de sondas moleculares fluorescentes se optimizó en la reacción múltiple de manera que para al menos uno de los conjuntos de cebadores y sondas la concentración fuera menor que en la reacción individual. A partir de esto se deduce que, con una

concentración menor de cebadores, menos sensible sería la reacción, o al menos, menos rápida. Se tardará más tiempo en alcanzar la etapa exponencial de la reacción de amplificación y por tanto más tiempo en detectar los productos. La concentración de los cebadores no será una limitación para la concentración final del producto en la reacción de NASBA, ya que el ADN bicatenario creado a partir de los cebadores continuará sirviendo como molde para la ARN polimerasa una y otra vez de nuevo en un bucle. La sensibilidad del NASBA múltiple simultáneo en tiempo real era la misma para VPH 16 y VPH 18 en comparación con el NASBA individual en tiempo real, pero la sensibilidad para L1 disminuyó drásticamente desde un límite de detección de 10 (1) en la reacción individual hasta  $10^3$  ( $10^2$ ) células CaSki en la reacción múltiple. Para los cebadores de NASBA para U1A, la sensibilidad disminuyó desde 10 (1) a  $10^2$  (10) células SiHa, mientras que el límite de detección permanecía igual para las células CaSki. Esta disminución del límite de detección puede deberse a una competición más compleja de los cebadores y sondas moleculares fluorescentes en la reacción múltiple. La concentración final de cebadores y sondas moleculares fluorescentes puede no ser la mejor y los diferentes cebadores y sondas moleculares fluorescentes en la reacción múltiple pueden interferir entre sí. Los cebadores de NASBA para U1A detectaron 1 célula HeLa. Podría esperarse el mismo nivel de detección en todas las estirpes celulares, pero la sensibilidad de las células HeLa era 1/10 del nivel de detección de las células SiHa y CaSki. Estas estirpes celulares son células cancerosas y podrían tener diferente impacto en las células de manera que la expresión de U1A fuera diferente. Las diferencias también pueden deberse a la diferente cantidad de células en cada reacción, debido a errores de recuento durante la recogida de las células.

El NASBA en tiempo real no mostró reactividad cruzada entre VPH 16, 18, 31 y 33 o con VPH 6/11, 35, 39, 45, 51, 52, 58 o VPH X.

La especificidad de la reacción de PCR puede ser mejor que la especificidad de la reacción de NASBA en tiempo real debido a que la reacción de NASBA es una reacción isotérmica a 41 °C, sin posibilidad de cambiar la temperatura de hibridación de los cebadores. Los cebadores se diseñan básicamente de la misma forma que los cebadores de PCR. En una reacción de PCR se tiene la posibilidad de cambiar la temperatura de hibridación, al contrario que en la reacción de NASBA, y por tanto, de elegir una temperatura de hibridación que sea óptima para los dos cebadores. Esto hace que la hibridación de los cebadores sea más específica. Los resultados de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel. Pero las sondas moleculares fluorescentes en la reacción de NASBA en tiempo real son un parámetro adicional en comparación con la PCR, y por tanto pueden conferir a la reacción de NASBA total una mejor especificidad. Es también más fácil encontrar dos regiones diferentes en la secuencia del ADN para la hibridación de los cebadores, ya que existe una flexibilidad en la longitud del producto de la PCR mucho mayor que para el producto del NASBA, que debe ser menor de 250 pb. Para la especificidad de la reacción del NASBA es importante elegir un área única que no esté conservada entre los diferentes tipos de VPH. Un par de desacoplamientos de pares de bases todavía puede proporcionar una amplificación o hibridación de la diana.

La detección de células CaSki (con estado integrado y episómico) con los cebadores de NASBA para L1 universales y no de células SiHa o Hela (ambas con el estado integrado) puede proporcionar una indicación de que el VPH integrado no presenta expresión de L1, mientras que el VPH en estado episómico puede tener expresión de L1.

En resumen, se ha desarrollado un ensayo de identificación para VPH de tipo 16, 18, 31 y 33 que puede identificar de manera precisa la expresión de los oncogenes E6/E7 de estos tipos de VPH. El ensayo puede identificar también la expresión de la proteína principal de la cápside, L1.

#### 45 Ejemplo 3 - Estudio clínico adicional en 190 pacientes

##### Pacientes/muestras clínicas

50 Biopsias procedentes de 190 mujeres admitidas en el Hospital Central de Østfold para tratamiento de CIN en el periodo de 1999-2001. La edad media de las 190 mujeres incluidas en el estudio fue de 37,4 años (intervalo 22-74 años). Las biopsias se congelaron a -80 °C inmediatamente después de su recogida.

##### Examen citológico de las muestras

55 Se utilizaron los informes citológicos habituales para registrar los hallazgos citológicos. No se intentó volver a evaluar los portaobjetos. Cada uno de ellos indicaba una afección CIN II-III, esto es una displasia de grado elevado o HSIL, que era la base para la admisión en el hospital, la colposcopia y la biopsia.

##### Examen histológico de las muestras

60 Se tomó una biopsia, denominada en el presente documento *biopsia 1*, después de un informe citológico de alto grado. Si confirmaba una lesión de alto grado (CIN II o III), la paciente se admitía de nuevo en el hospital, esta vez para una conización guiada colposcópica. Antes de la conización, pero después de aplicar anestesia local, se tomó una segunda biopsia (*biopsia 2*) de un área de una porción en la que era muy probable que se localizara una displasia, según se estimó a partir de los hallazgos macroscópicos. Esta biopsia (2 x 2 mm) se congeló en los 2 minutos siguientes en un congelador de -80 °C.

La *biopsia 2* se dividió en dos cuando se congeló y la mitad se utilizó para la extracción de ADN/ARN. La otra mitad se fijó en formaldehído tamponado al 10 % y se procesó para el examen histopatológico. Algunas lesiones no estaban orientadas correctamente en el bloque de parafina y tuvieron que ser reorientadas o seccionadas en serie para mostrar el epitelio superficial relevante. En consecuencia, no pudo garantizarse que se hubiera utilizado exactamente el mismo tejido para la extracción y para la evaluación histopatológica. La muestra de ensayo cónica, finalmente, fue evaluada por el patólogo local que en todos los casos pudo confirmar la presencia de displasia. No era siempre el mismo grado que en la biopsia original y, en muchos casos, no era el mismo que en la *biopsia 2*.

#### Extracción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos se aislaron utilizando el Nuclisens Extractor automatizado según se describió previamente (Boom y col., 1990). Cada biopsia se cortó en dos fragmentos, uno destinado al examen histológico y la otra mitad para el análisis de ARN. El material destinado al análisis de ARN se dividió en fragmentos más pequeños mientras se mantenía en nieve carbónica (-80 °C) y se puso en 1 ml de tampón de lisis (igual que anteriormente) seguido de 20 segundos de homogenización utilizando trituradores desechables. Se diluyeron cien mililitros de la muestra posteriormente 10 veces en tampón de lisis y después se extrajeron 100 µl para determinar ADN/ARN. El ADN/ARN extraído se diluyó con ~40 ml de tampón de elución (Organon Teknika) y se almacenó a -70 °C.

Todas las sondas moleculares fluorescentes ("balizas") utilizadas en este estudio emplean el fluoróforo FAM (6-carboxifluoresceína) en el extremo 5' de la estructura. Éste se unió a una secuencia variable del bucle troncal acoplada al inactivador universal ácido 4-(4'-diametilaminofenilazo)benzoico (DABCYL) en el extremo 3'. Las sondas fueron suministradas por Eurogentec, Bélgica. La concentración final de sondas moleculares fluorescentes utilizada en la reacción fue de 2,5 mM. Para el NASBA en tiempo real se utilizó el kit Nuclisens Basic Kit (Organon Teknika, Países Bajos), destinado al desarrollo de ensayos de amplificación de ARN definidos por el usuario. La amplificación mediante NASBA se realizó en un volumen de 20 µl. Los conjuntos de cebadores y las sondas se dirigieron contra el ARNm de E6/E7 de longitud completa de los VPH de alto riesgo 16, 18, 31 y 33. Como control de funcionamiento, para evitar resultados negativos falsos debido a la degradación del ácido nucleico, se utilizó un conjunto de cebadores y una sonda dirigidos contra la proteína A específica de la ribonucleoproteína nuclear pequeña (snRNP) U1 humana (ARNm de U1A) (Nelissen y col., 1991). Todas las muestras se procesaron por duplicado en máquinas separadas (lectores de microplacas para medir la fluorescencia y la absorbancia, Bio-tek FL-600 FA de MWG). El ARNm aislado de células CaSki/SiHa o HeLa sirvió como control positivo para los transcritos de VPH 16 y VPH 18, respectivamente. Los controles negativos, incluidos para cada reacción 7, consistían en una reacción que contenía todos los reactivos excepto ARNm.

#### Análisis del ADN del VPH; Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se utilizaron para la PCR los mismos extractos y las mismas cantidades que las utilizadas en la reacción de NASBA. Se utilizaron los cebadores Gp5+/Gp6+ consenso para L1 con el fin de detectar todas las muestras que contenían ADN de VPH. La amplificación por PCR se realizó según se describió anteriormente. La primera desnaturalización del ADN se realizó durante 2 minutos a 94 °C, posteriormente se realizaron 40 ciclos de PCR: desnaturalización durante 1 minuto a 94 °C, hibridación durante 2 minutos a 40 °C, extensión durante 1,5 minutos a 72 °C, seguido por una extensión final durante 4 minutos a 72 °C. La tipificación del VPH se realizó utilizando cebadores de PCR específicos de tipo frente a VPH 16, 18, 31 y 33 (6/11, 35, 45, 51, 52, 58), según se ha descrito anteriormente.

#### Resultados

Originalmente se sometieron a biopsia 190 pacientes después de haber sido diagnosticadas de CIN I, CIN II o CIN III mediante citología. Se confirmó una lesión de alto grado mediante examen histológico, se diagnosticaron 150 muestras como CIN III (78,9 %). La *biopsia 2*, tomada antes de la conización, se utilizó para el análisis de ARN. Sin embargo, el examen histológico de esta biopsia diagnosticó solamente 53 muestras de las 150 originales como CIN III [a 54 no se les dio ningún diagnóstico, 24 se diagnosticaron como CIN II, 18 como CIN I y 4 como VPH/condiloma]. El número de muestras con CIN II aumentó de 16 (8,4 %) a 30 (15,8 %) [por la Histología I, 24 fueron diagnosticadas como CIN III, 4 como CIN II, 1 como carcinoma y 1 como CIN I. A 12 casos de CIN II de la Histología I se les dio un diagnóstico inferior en la Histología II]. El grado de CIN I aumentó de 6 muestras (3,2 %) a 32 muestras (16,8 %). Los 2 carcinomas de células escamosas se diagnosticaron en la Histología II como CIN III, el adenocarcinoma como CIN II. En 71 muestras (38,4 %), no se detectaron lesiones de grado alto.

Se detectó ARN oncogénico de VPH en 69 (36 %) de las 190 pacientes. De las 53 muestras (28 %) diagnosticadas como CIN III en la Histología II, se encontraron 40 casos (76 %) que presentaban la expresión oncogénica de VPH 16, 18, 31 o 33. Además, se encontró expresión oncogénica en 9 de 30 casos (30 %) de CIN II, en 4 de 32 casos (13 %) de CIN I, en 14 de 71 casos (20 %) que no presentaban anomalías celulares y en 2 de 4 muestras (50 %) diagnosticadas como VPH/condiloma.

Se encontró ARN de VPH 16 en 42 de las 190 pacientes, se encontró VPH 18 en 7 (3,7 %), VPH 31 en 15 (7,9 %) y VPH 33 en 8 (4,2 %). Una paciente tenía una infección mixta con VPH 16 y VPH 18, y una con VPH 16 y VPH 31.

Utilizando los cebadores consenso Gp5+/Gp6+ dirigidos contra el gen L1, que codifica la proteína principal de la cápside, la PCR detectó VPH en 81 de las 190 biopsias de cuello uterino (43 %). De los 119 casos a los que se dio un diagnóstico en el segundo examen histológico (115 diagnosticados como CIN, 4 como VPH/condiloma), se encontraron 63 que contenían ADN de VPH. A los 18 casos adicionales detectados no se les dio ningún diagnóstico histológico. De los 81 casos, 20 no se detectaron mediante NASBA; a 7 de éstos se les dio el diagnóstico de CIN III, 2 se diagnosticaron como CIN II, 4 se diagnosticaron como CIN I y a 7 no se les dio ningún diagnóstico.

La PCR específica de tipo detectó 85 casos que contenían VPH; 66 que tenían VPH 16, 10 VPH 18, 14 VPH 31 y 7 VPH 33. Doce casos tenían infección múltiple: 3 con VPH 16+18, 4 con VPH 16+33, 5 con VPH 16+31. Hubo 20 sin diagnóstico.

Ejemplo 4

VPH detectado por PreTect VPH-Proofer y PCR en comparación con la citología y la Histología.

Se determinaron por citología muestras normales y de ASCUS (incluyendo frotis dudosos). Todas las muestras se analizaron con PCR consenso y PreTect VPH-Proofer, pero solo las muestras positivas para el consenso se tipificaron por PCR. Las muestras con CIN III y cáncer se determinaron por histología y todas las muestras se analizaron con los tres métodos. Los resultados se muestran en la Figura 6. La concordancia entre el NASBA múltiple simultáneo en tiempo real y la PCR en comparación con la citología o la histología se muestra en la Tabla 15 siguiente.

Tabla 15: Concordancia entre el NASBA múltiple en tiempo real y la PCR en comparación con la citología o la histología

Citología/Histología	Concordancia <sup>a</sup> (Número)	Concordancia <sup>b</sup> (Número)
Normal	98,2 % (4043)	42,8 % (138)
ASCUS <sup>c</sup>	94,5 % (55)	78,6 % (14)
CIN III	94,3 % (53)	93,2 % (44)
Cáncer	99,0 % (196)	98,8 % (170)

Solamente se han tipificado las muestras positivas por la PCR con Gp5+/6+.  
<sup>a</sup> Incluyendo muestras positivas y negativas en PCR y NASBA múltiple simultáneo en tiempo real.  
<sup>b</sup> Incluyendo solamente las muestras positivas en PCR y/o en NASBA múltiple simultáneo en tiempo real.  
<sup>c</sup> ASCUS excluyendo los frotis dudosos.

Ejemplo 5

En el presente documento se describe un kit para la detección de transcritos de ARNm del gen o los genes E6 de VPH, conteniendo el kit uno o más de, dos o más de, y preferentemente todos, los pares de cebadores siguientes y las sondas de identificación acompañantes.  
 HPV 16:HPV 16.txt 7905 pb

HPV16P2:  
 p2:116 (20) GATGCAAGGTCGCATATGAGCCACAGGAGCGACCCAGAAA  
 16 pl (N.º7)  
 AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGG ATT CCC ATC TCT ATA TAC TA (51 bases)

HPV16PO2:  
 po:230 (20) TATGACTTTGCTTTTCGGGA  
 H16e6702po

HPV 18:HPV 18.txt 7857 pb

HPV18P2:  
 p2:698 (22) GATGCAAGGTCGCATATGAGGAAAACGATGAAATAGATGGAG  
 H18e6702p2

HPV18P4:  
 p1:817 (20) AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGGTCGTCTGCTGAGCTTTCT  
 H18e6703p1 (Múltiple)

HPV18PO2:  
 po:752 (21) GAACCACAACGTCACACAATG  
 H18e6702po

## ES 2 654 909 T3

HPV 31:HPV 31.txt 7912 pb

HPV31P3:

5 p2:617 (20) GATGCAAGGTCGCATATGAGACTGACCTCCACTGTTATGA  
H31e6703p2  
p1:766 (20)  
AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTATCTACTTGTGTGCTCTGT  
H31e6703p1

HPV31PO4:

10 Po:686 (26) GGACAAGCAGAACCGGACACATCCAA  
H31e6704po

HPV 33:HPV 33.txt 7909 pb

HPV33P1:

15 p2:618 (22) GATGCAAGGTCGCATATGAGTATCCTGAACCAACTGACCTAT  
H33e6701p2  
20 p1:763 (19) AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTTGACACATAAACGAACTG  
H33e6701p1

HPV33PO3:

25 po:699 (23) GGACAAGCACAACCAGCCACAAGC  
H33e6703po

Como alternativa a las sondas mostradas anteriormente, el kit puede incluir opcionalmente una o más de las sondas moleculares fluorescentes ("balizas") siguientes:

### Sondas Moleculares Fluorescentes ("balizas"):

30 H16e6702mb2-FAM ccagctTATGACTTTGCTTTTCGGGAagctgg  
H18e6702mb1-TxR cgcacgGAACCACAACGTCACACAATGcatgcg  
H31e6704mb2-FAM ccgtcgGGACAAGCAGAACCGGACACATCCAacgacgg  
35 H33e6703mb1-FAM ccaagcGGACAAGCACAACCAGCCACAGCgcttgg

Preferentemente, el kit incluye también los siguientes pares de cebadores y sondas:

HPV 45: HPV 45.txt 7858 pb (X74479)

HPV45P1:

40 p2:430 (21) GATGCAAGGTCGCATATGAGAACCATTGAACCCAGCAGAAA  
H45e6701p2  
p1:527 (22) AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCTTTCTTGCCGTGCCTGGTCA  
45 H45e6701p1

HPV45PO1:

50 po:500 (20) GTACCGAGGGCAGTGTAAATA  
H45e6701po

La sonda de VPH 45 anterior puede reemplazarse por una sonda molecular fluorescente para VPH como se indica a continuación:

H45e6701mb1 cgcacgGTACCGAGGGCAGTGTAAATAcgcacg

Además, el kit puede incluir uno o más de los pares de cebadores y sondas de identificación acompañantes siguientes, dependiendo del área geográfica de utilización del kit.

HPV 52:HPV 52.txt 7942 pb (X74481)

HPV52P1:

60 p2:144 (22) GATGCAAGGTCGCATATGAGTTGTGTGAGGTGCTGGAAGAAT  
H52e6701p2  
p1:358 (18) AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCCTCTCTTAATGTTT  
65 H52e6701p1

HPV52PO1:

Po:296 (20) GTGCCTACGCTTTTTATCTA

# ES 2 654 909 T3

H52e6701po

HPV 58:HPV 58.txt 7824 pb (D90400)

5  
p2:173 (18) HPV58P2:  
H58e6702p2 GATGCAAGGTCGCATATGAGTCTGTGCATGAAATCGAA  
p1:291 (18)  
H58e6702p1 AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGAGCACACTTTACATACTG

10  
po:218 (22) HPV58PO2:  
H58e6702po TTGCAGCGATCTGAGGTATATG

15 HPV 51:HPV 51.txt 7808 pb (M62877)

p2:655 (23) HPV51PA/P:  
H51e6702p2 GATGCAAGGTCGCATATGAG AGA GGA GGA GGA TGA AGT AGA TA  
20 p1:807 (20)  
H51e6701p1 AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCCCATTAACAT CTG CTG TA

25 po:771 (24) HPV51POA:  
H51e6702po TGG CAG TGG AAA GCA GTG GAG ACA

Las sondas mostradas anteriormente pueden reemplazarse en el kit por las sondas moleculares fluorescentes ("balizas") siguientes:

30 H52e6701mb1 cgatcgGTGCCTACGCTTTTTATCTAcgatcg  
H58e6702mb1 ccgtcgTTGCAGCGATCTGAGGTATATGcgacgg  
H51e6702mb1 cgatcgTTG CAG TGG AAA GCA GTG GAG ACAcgatcg

## LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Pretect AS

<120> MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ARNm DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

40 <130> P58858EP06

<140> EP  
<141> 07-01-2003

45 <150> GB0200239  
<151> 07-01-2002

<150> GB0214124  
<151> 19-06-2002

50 <160> 345

<170> PatentIn Versión 3.1

55 <210> 1  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificial

60 <400> 1  
ccacaggagc gaccagaaa gtta 24

<210> 2  
<211> 22  
65 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 2  
 5 acggttgtt gtattgctgt tc 2  
  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 3  
 15 ccacaggagc gaccagaaa 20  
  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 4  
 25 ggtttgtt attgctgttc 20  
  
 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 5  
 35 attcccatct ctatatacta 20  
  
 <210> 6  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 6  
 50 tcacgtcgca gtaactgt 18  
  
 <210> 7  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 7  
 60 ttgcttcag tacacaca 18  
  
 <210> 8  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 8  
 5    tgcagtacac acattcta   18  
  
 <210> 9  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 10   <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 9  
 15    gcagtacaca cattctaa   18  
  
 <210> 10  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 20   <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 10  
 25    acagttatgc acagagct   18  
  
 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 30   <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 11  
 35    atattagaat gtgtgtac   18  
  
 <210> 12  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 40   <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 12  
 45    ttagaatgtg tgtactgc   18  
  
 <210> 13  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 50   <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 13  
 55    gaatgtgtgt actgcaag   18  
  
 <210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 60   <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 13  
 65    gaatgtgtgt actgcaag   18  
  
 <210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 65   <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 14  
 5 acagttatgc acagagct 18  
  
 <210> 15  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 15  
 15 atattagaat gtgtgtac 18  
  
 <210> 16  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 16  
 25 ttagaatgtg tgtactgc 18  
  
 <210> 17  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 17  
 35 gaatgtgtgt actgcaag 18  
  
 <210> 18  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 18  
 50 cttgctttt cgggatttat gc 22  
  
 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 19  
 60 tatgactttg cttttcgga 20  
  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 20  
 5 tatgacttg ctttcgga 20  
  
 <210> 21  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 21  
 15 cagaggagga g gatgaaata gta 23  
  
 <210> 22  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 22  
 25 gcacaaccga agcgtagagt cacac 25  
  
 <210> 23  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 23  
 35 tggacaagca gaaccggaca gagc 24  
  
 <210> 24  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 24  
 45 cagaggagga g gatgaaata ga 22  
  
 <210> 25  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 25  
 55 gcacaaccga agcgtagagt ca 22  
  
 <210> 26  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 65

<220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 26  
 5 agcagaaccg gacagagccc atta 24  
  
 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 27  
 15 acgatgaaat agatggagtt 20  
  
 <210> 28  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 28  
 25 cacggacaca caaaggacag 20  
  
 <210> 29  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 29  
 35 agcccgaacca caacgtcaca 20  
  
 <210> 30  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 30  
 45 gaaaacgatg aaatagatgg ag 22  
  
 <210> 31  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 31  
 55 acaccacgga cacacaaagg acag 24  
  
 <210> 32  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 65

# ES 2 654 909 T3

	<220>		
	<223> Sonda de VPH		
5	<400> 32	gaaccacaac gtcacacaat g	21
	<210> 33		
	<211> 21		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda de VPH		
15	<400> 33	gaaccacaac gtcacacaat g	21
	<210> 34		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador de VPH		
25	<400> 34	ttccggttga ccttctatgt	20
	<210> 35		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador de VPH		
35	<400> 35	ggtcgtctgc tgagctttct	20
	<210> 36		
	<211> 21		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador de VPH		
45	<400> 36	gcaagacata gaaataacct g	21
50	<210> 37		
	<211> 18		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador de VPH		
60	<400> 37	accagtggt agttagtt	18
	<210> 38		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Sonda de VPH		
5	<400> 38 tgcaagacag tattggaact	20	
	<210> 39		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador de VPH		
15	<400> 39 ggaaataccc tacgatgaac	20	
	<210> 40		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador de VPH		
25	<400> 40 ggacacaacg gctttgaca	20	
	<210> 41		
30	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Sonda de VPH		
	<400> 41 atagggacga cacaccacac ggag	24	
40	<210> 42		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> cebador de VPH		
	<400> 42 ggaaataccc tacgatgaac ta	22	
50	<210> 43		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> cebador de VPH		
	<400> 43 ctggacacaa cggctttga ca	22	
60	<210> 44		
	<211> 22		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

<220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 44  
 5 tagggacgac acaccacacg ga 22  
  
 <210> 45  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 45  
 15 actgacctcc actgttatga 20  
  
 <210> 46  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 46  
 25 tatctacttg tgtgctctgt 20  
  
 <210> 47  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 47  
 35 gacaagcaga accggacaca tc 22  
  
 <210> 48  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 48  
 45 tgacctccac tgttatgagc aatt 24  
  
 <210> 49  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 49  
 55 tgcgaataac tacttggtg ctctgt 26  
  
 <210> 50  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 65

ES 2 654 909 T3

<220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 50  
 5 ggacaagcag aaccggacac atccaa 26  
  
 <210> 51  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 51  
 15 ggacaagcag aaccggacac atccaa 26  
  
 <210> 52  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 52  
 25 actgacctcc actgttat 18  
  
 <210> 53  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 53  
 35 cacgattcca aatgagccca t 21  
  
 <210> 54  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 54  
 45 tatcctgaac caactgacct at 22  
  
 <210> 55  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 55  
 55 ttgacacata aacgaactg 19  
  
 <210> 56  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 65

ES 2 654 909 T3

<220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 5 <400> 56  
 cagatggaca agcacaacc 19  
  
 10 <210> 57  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador de VPH  
 <400> 57  
 tcctgaacca actgacctat 20  
  
 20 <210> 58  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> cebador de VPH  
 <400> 58  
 ccataagta gttgctgtat 20  
  
 30 <210> 59  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
 <400> 59  
 ggacaagcac aaccagccac agc 23  
  
 40 <210> 60  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
 <400> 60  
 ggacaagcac aaccagccac agc 23  
  
 50 <210> 61  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> cebador de VPH  
 <400> 61  
 gaccttgtg tcctcaagaa 20  
  
 60 <210> 62  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 65

	<220> <223> cebador de VPH	
5	<400> 62 aggtcagttg gttcaggata	20
10	<210> 63 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sonda de VPH	
20	<400> 63 agaaaactgca ctgtgacgtg t	21
25	<210> 64 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador de VPH	
35	<400> 64 attacagcgg agtgaggtat	20
40	<210> 65 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador de VPH	
50	<400> 65 gtctttgctt ttcaactgga	20
55	<210> 66 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Sonda de VPH	
65	<400> 66 atagagaagg ccagccatat	20
70	<210> 67 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
75	<220> <223> cebador de VPH	
80	<400> 67 tcagaggagg aggaagatac ta	22
85	<210> 68 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> cebador de VPH	
5	<400> 68 gattatgctc tctgtgaaca	20
10	<210> 69 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador de VPH	
	<400> 69 cccgaggcaa ctgacctata	20
20	<210> 70 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador de VPH	
	<400> 70 gtcaatgtgt gtgctctgta	20
30	<210> 71 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sonda de VPH	
	<400> 71 gacaagcaaa accagacacc tccaa	25
40	<210> 72 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sonda de VPH	
50	<400> 72 gacaagcaaa accagacacc	20
55	<210> 73 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador de VPH	
	<400> 73 ttgtgtgagg tgctggaaga at	22
65	<210> 74 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 74  
 5 ccctctcttc taatgttt 18  
  
 <210> 75  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 75  
 15 gtgcctacgc ttttatcta 20  
  
 <210> 76  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 76  
 25 gtgcctacgc ttttatcta 20  
  
 <210> 77  
 <211> 22  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 77  
 35 ggggtctcca aactctgaa ca 22  
  
 <210> 78  
 <211> 18  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 78  
 50 tgcaaacaag cgatttca 18  
  
 <210> 79  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 79  
 60 tcaggcgttg gagacatc 18  
  
 <210> 80  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 80  
 5 agcaatcgta agcacact 18  
  
 <210> 81  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 81  
 15 tctgtgcatg aaatcgaa 18  
  
 <210> 82  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 82  
 25 agcacacttt acatactg 18  
  
 <210> 83  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 83  
 35 tgaaatgcgt tgaatgca 18  
  
 <210> 84  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 84  
 45 ttgcagcgt ctgaggtata tg 22  
  
 <210> 85  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 85  
 55 tacactgctg gacaacat 18  
  
 <210> 86  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 <210> 86  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 86  
 5 tcatcttctg agctgtct 18  
  
 <210> 87  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 87  
 15 tacactgctg gacaacatgc a 21  
  
 <210> 88  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 88  
 25 gtcacatcca cagcaacagg tca 23  
  
 <210> 89  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 89  
 35 gtagggttac attgctatga 20  
  
 <210> 90  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 90  
 45 gtagggttac attgctatga gc 22  
  
 <210> 91  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 91  
 55 tgacctgttg ctgtggatgt ga 22  
  
 <210> 92  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 91  
 65 tgacctgttg ctgtggatgt ga 22  
  
 <210> 92  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 92  
 5    tacctgaatc gtccgcat    19  
  
 <210> 93  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 10    <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 93  
 15    atwgtgtgtc ccatctgc    18  
  
 <210> 94  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 20    <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 94  
 25    catgccataa atgtataga    19  
  
 <210> 95  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30    <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 95  
 35    caccgcaggc acctattaa    20  
  
 <210> 96  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 40    <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 96  
 50    agaattagag aattaaga    18  
  
 <210> 97  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 55    <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 97  
 60    gcagacgacc actacagcaa a    21  
  
 <210> 98  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 65    <213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> cebador de VPH	
5	<400> 98 acaccgagtc cgagtaata	19
10	<210> 99 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sonda de VPH	
20	<400> 99 atagggacgg ggaaccact	19
25	<210> 100 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador de VPH	
35	<400> 100 tattactcgg actcgggtg	19
40	<210> 101 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador de VPH	
50	<400> 101 ctgggttct tctcgtgtt a	21
55	<210> 102 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Sonda de VPH	
65	<400> 102 ggaccacaaa acgggaggac	20
70	<210> 103 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
75	<220> <223> cebador de VPH	
80	<400> 103 gaaatagatg aacccgacca	20
85	<210> 104 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 104  
 5 gcacaccacg gacacacaaa 20  
  
 <210> 105  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 105  
 15 tagccagacg ggatgaacca cagc 24  
  
 <210> 106  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 106  
 25 aaccattgaa cccagcagaa a 21  
  
 <210> 107  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 107  
 35 tctttcttgc cgtgcctggt ca 22  
  
 <210> 108  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 108  
 45 gtaccgaggg cagtgaata 20  
  
 <210> 109  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 109  
 55 aaccattgaa cccagcagaa a 21  
  
 <210> 110  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 65

<220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 5 <400> 110  
 tctttctgc cgtgcctggt ca 22  
  
 10 <210> 111  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 111  
 gaaaccattg aaccagcag aaaa 24  
  
 20 <210> 112  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 112  
 ttgctatact tgtgttccc tacg 24  
  
 30 <210> 113  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 113  
 gtaccgaggg cagtgaata 20  
  
 40 <210> 114  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 114  
 ggacaaacga agattcaca 20  
  
 50 <210> 115  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 115  
 gttgacctgt tgtgtacca gcaat 25  
  
 60 <210> 116  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 65

<220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 116  
 5 caccacggac acacaaagga caag 24  
  
 <210> 117  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 117  
 15 ctgttgacct gttgtgttac ga 22  
  
 <210> 118  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 118  
 25 ccacggacac acaaaggaca ag 22  
  
 <210> 119  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 119  
 35 gttgacctgt tgtgttacga 20  
  
 <210> 120  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 120  
 45 acggacacac aaaggacaag 20  
  
 <210> 121  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 121  
 55 gagtcagagg aggaaaacga tg 22  
  
 <210> 122  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 <210> 122  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 654 909 T3

<220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 5 <400> 122  
 aggaaaacga tgaagcagat ggagt 25  
  
 10 <210> 123  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
 <400> 123  
 acaactacca gcccgacgag ccgaa 25  
  
 20 <210> 124  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> cebador de VPH  
 <400> 124  
 ggaggaggat gaagtagata 20  
  
 30 <210> 125  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> cebador de VPH  
 <400> 125  
 gcccataac atctgctgta 20  
  
 40 <210> 126  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45 <220>  
 <223> cebador de VPH  
 <400> 126  
 agaggaggag gatgaagtag ata 23  
  
 50 <210> 127  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> cebador de VPH  
 <400> 127  
 acgggcaaac caggcttagt 20  
  
 60 <210> 128  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 65

	<220>		
	<223> Sonda de VPH		
5	<400> 128	gcaggtgttc aagtgtagta	20
	<210> 129		
	<211> 24		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda de VPH		
15	<400> 129	tggcagtgga aagcagtgga gaca	24
	<210> 130		
	<211> 24		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador de VPH		
25	<400> 130	ttgggtgtct ggagacaaac atct	24
	<210> 131		
	<211> 24		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador de VPH		
35	<400> 131	ttcatcctca tcctcatcct ctga	24
	<210> 132		
	<211> 22		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador de VPH		
45	<400> 132	tgggtgtctg gagacaaaca tc	22
	<210> 133		
	<211> 22		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador de VPH		
55	<400> 133	catcctcatc ctcatcctct ga	22
	<210> 134		
	<211> 22		
60	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65			

<220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 134  
 5 ttggggtgct ggagacaaac at 22  
  
 <210> 135  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 135  
 15 ccacaaactt aactcaca ca 22  
  
 <210> 136  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 136  
 25 aaagtaccaa cgctgcaaga cgt 23  
  
 <210> 137  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 137  
 35 agaactaaca cctcaaacag aaat 24  
  
 <210> 138  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de VPH  
  
 <400> 138  
 45 agtaccaacg ctgcaagacg tt 22  
  
 <210> 139  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 139  
 55 ttggacagct cagaggatga gg 22  
  
 <210> 140  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
  
 <400> 139  
 65 ttggacagct cagaggatga gg 22  
  
 <210> 140  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 654 909 T3

	<220> <223> cebador de VPH	
5	<400> 140 gatttcctt atgcagtg	20
10	<210> 141 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador de VPH	
20	<400> 141 gacatctgta gcacctatt	20
25	<210> 142 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sonda de VPH	
35	<400> 142 gactattcag tgtatggagc	20
40	<210> 143 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sonda de VPH	
50	<400> 143 caactgayct myactgttat ga	22
55	<210> 144 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Sonda de VPH	
65	<400> 144 caactgayct myactgttat ga	22
70	<210> 145 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
75	<220> <223> Sonda de VPH	
80	<400> 145 gaamcaactg acctaywctg ctat	24
85	<210> 146 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Sonda de VPH		
5	<400> 146	gaamcaactg acctaywctg ctat	24
	<210> 147		
	<211> 18		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda de VPH		
15	<400> 147	aagacattat tcagactc	18
	<210> 148		
	<211> 18		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda de VPH		
25	<400> 148	aagacattat tcagactc	18
	<210> 149		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> cebador de VPH		
	<400> 149	aatggcattt gttgggtaa	20
40	<210> 150		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> cebador de VPH		
	<400> 150	tcatattcct ccccatgtc	19
50	<210> 151		
	<211> 22		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda de VPH		
60	<400> 151	ttgttactgt tgttgatact ac	22
	<210> 152		
	<211> 20		
65	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

	<220> <223> cebador de VPH	
5	<400> 152 aatggcattt gttggsrhaa	20
10	<210> 153 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador de VPH	
20	<400> 153 tcatattcct cmmcatgdc	19
25	<210> 154 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sonda de VPH	
35	<400> 154 ttgttactgt tgttgatacy ac	22
40	<210> 155 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sonda de VPH	
50	<400> 155 ttgttactgt tgttgatacc ac	22
55	<210> 156 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador de VPH	
65	<220> <221> misc_feature <222> (17)..(17) <223> "n" representa inosina	
70	<220> <221> misc_feature <222> (18)..(18) <223> "n" representa inosina	
75	<400> 156 aatggcattt gttggsnnaa	20
80	<210> 157 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
85	<220>	

<223> cebador de VPH  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> "n" representa inosina  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(17)  
 <223> "n" representa inosina  
 10  
 <400> 157  
 aatggcattt gttggnnhaa                    20  
 15  
 <210> 158  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> "n" representa inosina  
 25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> "n" representa inosina  
 30  
 <400> 158  
 aatggcattt gttggnrnaa                    20  
 35  
 <210> 159  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
 45  
 <400> 159  
 actggcattt gttggggtaa                    20  
 <210> 160  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
 55  
 <400> 160  
 aatggcattt gttggggaaa                    20  
 <210> 161  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> cebador de VPH  
 65

	<400> 161 aatggcattt gttggcataa	20
5	<210> 162 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador de VPH	
	<400> 162 aatggcattt gttggggcaa	20
15	<210> 163 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador de VPH	
	<400> 163 aatggcattt gttggcacia	20
25	<210> 164 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador de VPH	
35	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(13) <223> "n" representa inosina	
40	<220> <221> misc_feature <222> (18)..(18) <223> "n" representa inosina	
45	<400> 164 tcatattcct cmncatgnc	19
50	<210> 165 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador de VPH	
	<220> <221> misc_feature <222> (18)..(18) <223> "n" representa inosina	
60	<400> 165 tcatattcct caacatgnc	19
65	<210> 166 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>  
 <223> cebador de VPH

5      <220>  
          <221> misc\_feature  
          <222> (12)..(12)  
          <223> "n" representa inosina

10     <220>  
          <221> misc\_feature  
          <222> (13)..(13)  
          <223> "n" representa inosina

15     <400> 166  
          tcatattcct cncatgct                      19

         <210> 167  
          <211> 19  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

20     <220>  
          <223> cebador de VPH

25     <220>  
          <221> misc\_feature  
          <222> (12)..(12)  
          <223> "n" representa inosina

30     <220>  
          <221> misc\_feature  
          <222> (13)..(13)  
          <223> "n" representa inosina

35     <400> 167  
          tcatattcct cncatggc                      19

40     <210> 168  
          <211> 19  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

45     <220>  
          <223> cebador de VPH

50     <220>  
          <221> misc\_feature  
          <222> (12)..(12)  
          <223> "n" representa inosina

55     <220>  
          <221> misc\_feature  
          <222> (13)..(13)  
          <223> "n" representa inosina

         <400> 168  
          tcatattcct cncatgac                      19

60     <210> 169  
          <211> 19  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

65     <220>  
          <223> cebador de VPH

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 <223> "n" representa inosina  
 5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> "n" representa inosina  
 10

<400> 169  
 tcatattcct cncatgcc 19

<210> 170  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15

<220>  
 <223> Secuencia para su incorporación en cebadores del NASBA para facilitar la hibridación con la sonda de  
 detección universal ECL  
 20

<400> 170  
 gatgcaaggt cgcatatgag 20  
 25

<210> 171  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30

<220>  
 <223> Secuencia promotora para su incorporación en los oligonucleótidos cebadores P1 del NASBA  
 35

<400> 171  
 aattctaata cgactcacta taggg 25

<210> 172  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40

<220>  
 <223> Secuencia promotora para su incorporación en los oligonucleótidos cebadores P1 del NASBA  
 45

<400> 172  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag g 31

<210> 173  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH  
 55

<400> 173  
 gatgcaaggt cgcatatgag ccacaggagc gaccagaaa gtta 44

<210> 174  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH  
 65

ES 2 654 909 T3

	<400> 174	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gacggttgt tgtattgctg ttc	53
5	<210> 175 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 175	
	gatgcaaggt cgcatatgag ccacaggagc gaccagaaaa	40
15	<210> 176 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 176	
25	aattctaata cgactcacta tagggagaag gggtttgtg tattgctgtt c	51
	<210> 177 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 177	
35	aattctaata cgactcacta tagggagaag gattcccatc tctatatact a	51
	<210> 178 <211> 49 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 178	
45	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcacgtcgc agtaactgt	49
	<210> 179 <211> 49 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 179	
55	aattctaata cgactcacta tagggagaag gttgcttgca gtacacaca	49
	<210> 180 <211> 49 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 180	
65	aattctaata cgactcacta tagggagaag gttgcttgca gtacacaca	49
	<210> 180 <211> 49 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	

ES 2 654 909 T3

	<400> 180 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcagtagaca cacattcta	49
5	<210> 181 <211> 49 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 181 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggcagtagacac acattctaa	49
15	<210> 182 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
25	<400> 182 gatgcaaggt cgcatatgag acagttatgc acagagct	38
30	<210> 183 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 183 gatgcaaggt cgcatatgag atattagaat gtgtgtac	38
40	<210> 184 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 184 gatgcaaggt cgcatatgag ttagaatgtg tgtactgc	38
50	<210> 185 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 185 gatgcaaggt cgcatatgag gaatgtgtg actgcaag	38
60	<210> 186 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sonda molecular fluorescente para VPH	

<400> 186  
 cgcatgtatg actttgcttt tcgggacatg cg 32

5 <210> 187  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 187  
 ccagcttatg actttgcttt tcgggaagct gg 32

15 <210> 188  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 188  
 cacgctatga ctttgcttt cgggagcgtg 30

25 <210> 189  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 189  
 cgatcgtatg actttgcttt tcgggacgat cg 32

35 <210> 190  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

45 <400> 190  
 gatgcaaggc cgcatatgag cagaggagga ggatgaata gta 43

50 <210> 191  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 191  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggcacaaccg aagcgtagag tcacac 56

60 <210> 192  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

ES 2 654 909 T3

	<400> 192 gatgcaaggt cgcatatgag cagaggagga ggatgaata ga	42
5	<210> 193 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 193 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggcacaaccg aagcgtagag tca	53
15	<210> 194 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
25	<400> 194 gatgcaaggt cgcatatgag acgatgaaat agatggagtt	40
30	<210> 195 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 195 aattctaata cgactcacta tagggagaag gcacggacac acaaaggaca g	51
40	<210> 196 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 196 gatgcaaggt cgcatatgag gaaaacgatg aaatagatgg ag	42
50	<210> 197 <211> 55 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 197 aattctaata cgactcacta tagggagaag gacaccacgg acacacaaag gacag	55
60	<210> 198 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sonda molecular fluorescente para VPH	

<400> 198  
 cgcatggaac cacaacgtca cacaatgcat gcg 33

5 <210> 199  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 199  
 ccgtcggaac cacaacgtca cacaatgcga cgg 33

15 <210> 200  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 200  
 cggaccgaac cacaacgtca cacaatgggt ccg 33

25 <210> 201  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 201  
 cgatcggaac cacaacgtca cacaatgcga tcg 33

35 <210> 202  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

45 <400> 202  
 gatgcaaggc cgcatatgag ttccggttga cctctatgt 40

50 <210> 203  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 203  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gggctgtctg ctgagcttc 51

60 <210> 204  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

	<400> 204 gatgcaaggt cgcatatgag gcaagacata gaaataacct g	41
5	<210> 205 <211> 49 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 205 aattctaata cgactcacta tagggagaag gaccctagtgt tagttagtt	49
15	<210> 206 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
25	<400> 206 gatgcaaggt cgcatatgag ggaataaccc tacgatgaac	40
30	<210> 207 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 207 aattctaata cgactcacta tagggagaag gggacacaac ggtctttgac a	51
40	<210> 208 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 208 gatgcaaggt cgcatatgag ggaataaccc tacgatgaac ta	42
50	<210> 209 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 209 aattctaata cgactcacta tagggagaag gctggacaca acggtctttg aca	53
60	<210> 210 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	

<400> 210  
 gatgcaaggt cgcatatgag actgacctcc actgttatga 40

5 <210> 211  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 211  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtatctactt gtgtgctctg t 51

15 <210> 212  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 212  
 gatgcaaggt cgcatatgag tgacctccac tcttatgagc aatt 44

25 <210> 213  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 213  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtgcgaatat ctactgtgt gctctgt 57

35 <210> 214  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 214  
 ccgaagggga caagcagaac cggacacatc caacctcgg 40

45 <210> 215  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 215  
 ccgtcgggac aagcagaacc ggacacatcc aacgacgg 38

55 <210> 216  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

65 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

ES 2 654 909 T3

<400> 216  
 cacgtcggga caagcagaac cggacacatc caacgacgtg 40

5  
 <210> 217  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 217  
 cgcagcggac aagcagaacc ggacacatcc aagctgcg 38

15  
 <210> 218  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 218  
 cgatcgggac aagcagaacc ggacacatcc aacgatcg 38

25  
 <210> 219  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 219  
 gatgcaaggc cgcataatgag actgacctcc actgttat 38

40  
 <210> 220  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

45  
 <400> 220  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gcacgattcc aaatgagccc at 52

50  
 <210> 221  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

55  
 <400> 221  
 gatgcaaggc cgcataatgag tatcctgaac caactgacct at 42

60  
 <210> 222  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

65

<400> 222  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gttgacacat aaacgaactg 50

5 <210> 223  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 223  
 gatgcaaggt cgcatatgag tctgaccca actgacctat 40

15 <210> 224  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

25 <400> 224  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gcccataagt agttgctgta t 51

30 <210> 225  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 225  
 ccaagcggac aagcacaacc agccacagcg ctgg 35

40 <210> 226  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 226  
 ccaagcggga caagcacaac cagccacagc cgcttg 37

50 <210> 227  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 227  
 cccagcggac aagcacaacc agccacagcg ctggg 35

60 <210> 228  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

ES 2 654 909 T3

<400> 228  
 ccaaagcggga caagcacaac cagccacagc gctttgg 37

5 <210> 229  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 229  
 cctgctggaca agcacaacca gccacagcgc agg 33

15 <210> 230  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 230  
 cgatcgggac aagcacaacc agccacagcc gatcg 35

25 <210> 231  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 231  
 gatgcaaggc cgcatatgag gacctttgtg tctcaagaa 40

40 <210> 232  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

45 <400> 232  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gaggtcagtt ggtcaggat a 51

50 <210> 233  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

55 <400> 233  
 gatgcaaggc cgcatatgag attacagcgg agtgaggtat 40

60 <210> 234  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

65

# ES 2 654 909 T3

	<400> 234 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggtctttgct tttcaactgg a	51
5	<210> 235 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 235 gatgcaaggt cgcatatgag tcagaggagg aggaagatac ta	42
15	<210> 236 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
25	<400> 236 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggattatgct ctctgtgaac a	51
30	<210> 237 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 237 gatgcaaggt cgcatatgag cccgaggcaa ctgacctata	40
40	<210> 238 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 238 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggtcaatgtg tgtgctctgt a	51
50	<210> 239 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 239 gatgcaaggt cgcatatgag ttgtgtgagg tgctggaaga at	42
60	<210> 240 <211> 49 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	

ES 2 654 909 T3

<400> 240  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gccctctctt ctaatgtt 49

5 <210> 241  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 241  
 gatgcaaggt cgcatatgag gtcctacgc ttttatcta 40

15 <210> 242  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 242  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gggggtctcc aacctctga aca 53

25 <210> 243  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 243  
 gatgcaaggt cgcatatgag tcaggcgttg gagacatc 38

35 <210> 244  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 244  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gagcaatcgt aagcacact 49

45 <210> 245  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 245  
 gatgcaaggt cgcatatgag tctgtcatg aaatcgaa 38

55 <210> 246  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

65 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

ES 2 654 909 T3

<400> 246  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gagcacactt tacatactg 49

5 <210> 247  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 247  
 gatgcaaggt cgcatatgag tacactgctg gacaacat 38

15 <210> 248  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 248  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcacttct gagctgtct 49

25 <210> 249  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 249  
 gatgcaaggt cgcatatgag tacactgctg gacaacatgc a 41

35 <210> 250  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 250  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggtcacatcc acagcaacag gtca 54

45 <210> 251  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 251  
 gatgcaaggt cgcatatgag tgacctgttg ctgtggatgt ga 42

55 <210> 252  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

65 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

ES 2 654 909 T3

	<400> 252 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtacctgaat cgtccacat	50
5	<210> 253 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 253 gatgcaaggt cgcatatgag catgccataa atgtataga	39
15	<210> 254 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
25	<400> 254 aattctaata cgactcacta tagggagaag gcaccgcagg cacctatta a	51
30	<210> 255 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 255 gatgcaaggt cgcatatgag gcagacgacc actacagcaa a	41
40	<210> 256 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 256 aattctaata cgactcacta tagggagaag gacaccgagt ccgagtaata	50
50	<210> 257 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 257 gatgcaaggt cgcatatgag tattactcgg actcgggtg	39
60	<210> 258 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	

ES 2 654 909 T3

	<400> 258 aattctaata cgactcacta tagggagaag gcttgggttt ctctcgtgt ta	52
5	<210> 259 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 259 gatgcaaggt cgcatatgag gaaatagatg aacccgacca	40
15	<210> 260 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
25	<400> 260 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggcacaccac ggacacacaa a	51
30	<210> 261 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 261 gatgcaaggt cgcatatgag aaccattgaa cccagcagaa a	41
40	<210> 262 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 262 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtctttcttg ccgtgcctgg tca	53
50	<210> 263 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 263 gatgcaaggt cgcatatgag aaccattgaa cccagcagaa a	41
60	<210> 264 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	

ES 2 654 909 T3

<400> 264  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcttcttg ccgtgcctgg tca 53

5 <210> 265  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 265  
 gatgcaaggt cgcatatgag gaaaccattg aaccagcag aaaa 44

15 <210> 266  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 266  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gttgctatac ttgtgttcc ctacg 55

25 <210> 267  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 267  
 gatgcaaggt cgcatatgag gttgacctgt tgtgttacca gcaat 45

35 <210> 268  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 268  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gcaccacgga cacacaaagg acaag 55

45 <210> 269  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 269  
 gatgcaaggt cgcatatgag ctgttgacct gttgtgttac ga 42

55 <210> 270  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

65 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

# ES 2 654 909 T3

<400> 270  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gccacggaca cacaaaggac aag 53

5 <210> 271  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 271  
 gatgcaaggt cgcatatgag gttgacctgt tgtgttacga 40

15 <210> 272  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 272  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gacggacaca caaaggacaa g 51

25 <210> 273  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 273  
 gatgcaaggt cgcatatgag ggaggaggat gaagtagata 40

40 <210> 274  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

45 <400> 274  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggcccattaa catctgctgt a 51

50 <210> 275  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

55 <400> 275  
 gatgcaaggt cgcatatgag agaggaggag gatgaagtag ata 43

60 <210> 276  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

65

ES 2 654 909 T3

	<400> 276 aattctaata cgactcacta tagggagaag gacgggcaaa ccaggcttag t	51
5	<210> 277 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 277 gatgcaaggt cgcatatgag ttgggtgct ggagacaaac atct	44
15	<210> 278 <211> 55 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
25	<400> 278 aattctaata cgactcacta tagggagaag gttcatcctc atcctcatcc tctga	55
30	<210> 279 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 279 gatgcaaggt cgcatatgag ttgggtgctg gagacaaaca tc	42
40	<210> 280 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 280 aattctaata cgactcacta tagggagaag gcatcctcat cctcatcctc tga	53
50	<210> 281 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	
	<400> 281 gatgcaaggt cgcatatgag ttgggtgct ggagacaaac at	42
60	<210> 282 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador de NASBA para VPH	

<400> 282  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gccacaaact tacactcaca aca 53

5 <210> 283  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 283  
 gatgcaaggt cgcatatgag gattttcctt atgcagtgtg 40

15 <210> 284  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

25 <400> 284  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggacatctgt agcaccttat t 51

30 <210> 285  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 285  
 cgcatgcaac tgayctmyac tgttatgaca tgcg 34

40 <210> 286  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 286  
 ccgtcgcaac tgayctmyac tgttatgacg acgg 34

50 <210> 287  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 287  
 ccacccaac tgayctmyac tgttatgagg gtgg 34

60 <210> 288  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 288  
 cgatcgcaac tgayctmyac tggatgacg atcg 34

5 <210> 289  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 289  
 ccaagcgaam caactgacct aywctgctat gcttgg 36

15 <210> 290  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 290  
 ccaagccgaa mcaactgacc taywctgcta tggcttgg 38

25 <210> 291  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 291  
 ccaagccgaa mcaactgacc taywctgcta tggcttgg 38

40 <210> 292  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

45 <400> 292  
 ccagcgaam caactgacct aywctgctat cgctgg 36

<210> 293  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 293  
 cgatcggaam caactgacct aywctgctat cgatcg 36

55 <210> 294  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

65 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 294  
 ccaagcaaga cattattcag actcgcttgg 30

5 <210> 295  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 295  
 cgcatgaaga cattattcag actccatgcg 30

15 <210> 296  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 296  
 cccagcaaga cattattcag actcgctggg 30

25 <210> 297  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sonda molecular fluorescente para VPH

<400> 297  
 cgatcgaaga cattattcag actccgatcg 30

35 <210> 298  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

45 <400> 298  
 gatgcaaggc cgcatatgag aatggcattt gttggggtaa 40

50 <210> 299  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 299  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcattatcc tccccatgctc 50

60 <210> 300  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

ES 2 654 909 T3

<400> 300  
 gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggsrhaa 40

5 <210> 301  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

15 <400> 301  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcatttcc tcmcatgdc 50

<210> 302  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (37)..(37)  
 <223> "n" representa inosina

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (38)..(38)  
 <223> "n" representa inosina

35 <400> 302  
 gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggsnhaa 40

<210> 303  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (36)..(36)  
 <223> "n" representa inosina

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (37)..(37)  
 <223> "n" representa inosina

55 <400> 303  
 gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggnhaa 40

<210> 304  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

65 <220>  
 <221> misc\_feature

<222> (36)..(36)  
 <223> "n" representa inosina

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (38)..(38)  
 <223> "n" representa inosina

<400> 304  
 gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggnmaa 40

<210> 305  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 305  
 gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggggtaa 40

<210> 306  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 306  
 gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggggaaa 40

<210> 307  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 307  
 gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggcataa 40

<210> 308  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 308  
 gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggggcaa 40

<210> 309  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH

<400> 309  
 gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggcacia 40

ES 2 654 909 T3

<210> 310  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (44)..(44)  
 <223> "n" representa inosina  
 10  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (49)..(49)  
 <223> "n" representa inosina  
 15  
 <400> 310  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcatttcc tcmncattgnc 50  
 <210> 311  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (49)..(49)  
 <223> "n" representa inosina  
 30  
 <400> 311  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcatttcc tcaacatgnc 50  
 <210> 312  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (43)..(43)  
 <223> "n" representa inosina  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (44)..(44)  
 <223> "n" representa inosina  
 50  
 <400> 312  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcatttcc tcnncatgnc 50  
 <210> 313  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH  
 65

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (43)..(43)  
 <223> "n" representa inosina  
 5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (44)..(44)  
 <223> "n" representa inosina  
 10

<400> 313  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcattatcc tcnncatggc 50

<210> 314  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH  
 20

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (43)..(43)  
 <223> "n" representa inosina  
 25

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (44)..(44)  
 <223> "n" representa inosina  
 30

<400> 314  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcattatcc tcnncatgac 50

<210> 315  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35

<220>  
 <223> cebador de NASBA para VPH  
 40

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (43)..(43)  
 <223> "n" representa inosina  
 45

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (44)..(44)  
 <223> "n" representa inosina  
 50

<400> 315  
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcattatcc tcnncatgcc 50

<210> 316  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55

<220>  
 <223> cebador  
 60

<400> 316  
 tacactgctg gacaacat 18  
 65

ES 2 654 909 T3

<210> 317  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 317  
 10 tcactctctg agctgtct 18  
 <210> 318  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 20 <400> 318  
 tcaaaagcca ctgtgcctg a 21  
 <210> 319  
 <211> 21  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 30 <400> 319  
 cgtgttcttg atgatctgca a 21  
 <210> 320  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 40 <400> 320  
 ttccggttga cctctatgt 20  
 <210> 321  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 50 <400> 321  
 ggtcgtctgc tgagcttct 20  
 <210> 322  
 <211> 23  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 60 <400> 322  
 65 ctacagtaag cattgtgcta tgc 23

ES 2 654 909 T3

<210> 323  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 323  
 10 acgtaatgga gaggtgcaa taacc 26  
 <210> 324  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 20 <400> 324  
 aacgcatga gaggacaca g 21  
 <210> 325  
 <211> 21  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 30 <400> 325  
 acacataaac gaactgtgt g 21  
 <210> 326  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 40 <400> 326  
 cccgaggcaa ctgacctata 20  
 <210> 327  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 50 <400> 327  
 ggggcacact attcfaatg 20  
 <210> 328  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 60 <400> 328  
 65 gcagacgacc actacagca a 21

ES 2 654 909 T3

<210> 329  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 329  
 10 acaccgagtc cgagtaata 19  
 <210> 330  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 20 <400> 330  
 gaaaccattg aaccagcag aaaa 24  
 <210> 331  
 <211> 24  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 30 <400> 331  
 ttgctatact tgtgtttccc tacg 24  
 <210> 332  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 40 <400> 332  
 ggaggaggat gaagtagata 20  
 <210> 333  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 50 <400> 333  
 gccattaac atctgctgta 20  
 <210> 334  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 60 <400> 334  
 65 gtgcctacgc ttttatcta 20

ES 2 654 909 T3

<210> 335  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 335  
 10 ggggtctcca acactctgaa ca 22  
 <210> 336  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 20 <400> 336  
 tcaggcgttg gagacatc 18  
 <210> 337  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 30 <400> 337  
 agcaatcgta agcacact 18  
 <210> 338  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 40 <400> 338  
 ttgttactg tgtagatac tac 23  
 <210> 339  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 339  
 55 gaaaaataaa ctgtaatca tattc 25  
 <210> 340  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 340  
 65 acacaactgt gttcactagc 20

# ES 2 654 909 T3

5  
<210> 341  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> cebador  
  
10 <400> 341  
gaaacccaag agtcttctct 20  
  
15 <210> 342  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Sonda molecular fluorescente para VPH  
  
20 <400> 342  
cgatcgttac cgagggcagt gtaatacgat cg 32  
  
25 <210> 343  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Sonda molecular fluorescente para VPH  
  
30 <400> 343  
cgatcgtgac ctacgcttt tatctacgat cg 32  
  
35 <210> 344  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Sonda molecular fluorescente para VPH  
  
40 <400> 344  
ccgtcgtgac agcgcgatctga ggtatatgac acgg 34  
  
45 <210> 345  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
50 <220>  
<223> Sonda molecular fluorescente para VPH  
  
55 <400> 345  
cgatcgtggc agtggaaagc agtggagaca cgatcg 36

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método *in vitro* de cribado de sujetos humanos para evaluar su riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino, método que comprende el cribado del sujeto para determinar la expresión de transcritos de ARNm de longitud completa del gen E6 de VPH y la clasificación del sujeto en una de dos categorías de riesgo de desarrollar carcinoma de cuello uterino sobre la base de la expresión de dicho ARNm de E6, en el que los individuos positivos para la expresión de ARNm de E6 se califican como portadores de VPH integrado o de un genoma de VPH episómico modificado y, por tanto, se clasifican como de alto riesgo para el desarrollo de carcinoma de cuello uterino, mientras que los individuos negativos para la expresión de ARNm de E6 se califican como no portadores de VPH integrado un genoma de VPH episómico modificado y, por tanto, se clasifican como sin riesgo detectable para el desarrollo de carcinoma de cuello uterino.
- 10
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que los sujetos humanos son sujetos previamente identificados como infectados con ADN del virus del papiloma humano en células del cuello uterino.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que los sujetos humanos son sujetos que tienen un diagnóstico previo de ASCUS, lesiones CIN 1 o condiloma.
- 20 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende el cribado de la expresión de ARNm de E6 de longitud completa usando una técnica que es capaz de detectar ARNm de E6 de longitud completa de al menos un tipo de VPH asociado a cáncer.
- 25 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende el cribado de la expresión de ARNm de E6 de longitud completa usando una técnica que es capaz de detectar ARNm de E6 de longitud completa de VPH de tipo 16.
- 30 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5 en el que dichos transcritos de ARNm de E6 de longitud completa del tipo de VPH contienen toda la región desde el nucleótido 97 al 880 en el marco de lectura abierto de E6, incluyendo los nucleótidos 97 y 880.
- 35 7. Un método de acuerdo a la reivindicación 6 que comprende la detección específica de transcritos de longitud completa de VPH de tipo 16 usando una técnica de amplificación con cebadores que son específicos para una región que está presente solo en dichos transcritos de longitud completa.
- 40 8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el cribado para la expresión de ARNm de E6 se realiza usando una reacción de amplificación para amplificar una región del ARNm, junto con la detección en tiempo real de los productos de la reacción de amplificación.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el cribado para la expresión de ARNm de E6 se realiza usando NASBA en tiempo real.

FIG. 1A.

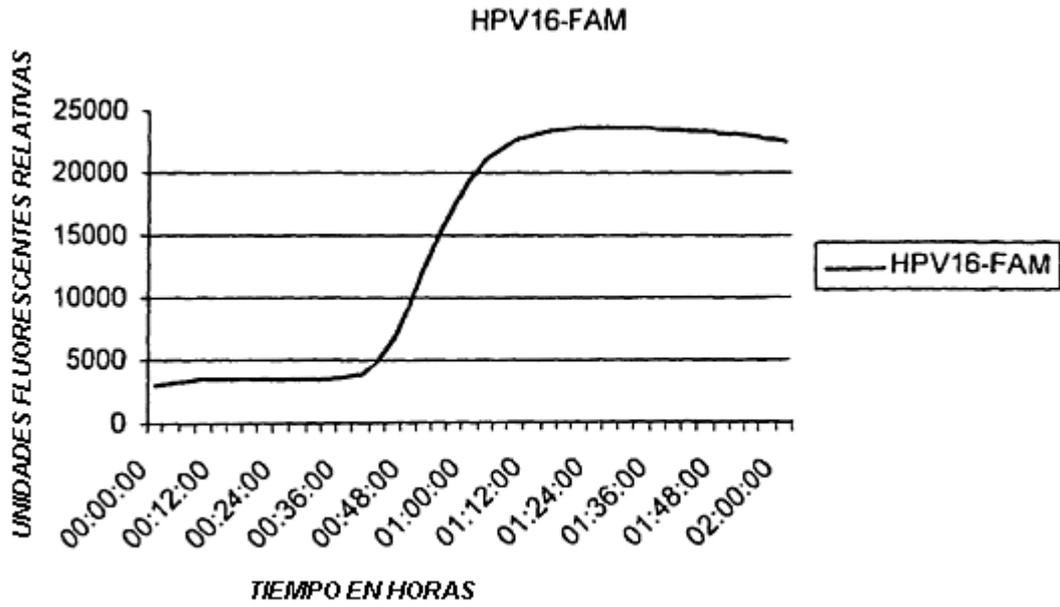


FIG. 1B.

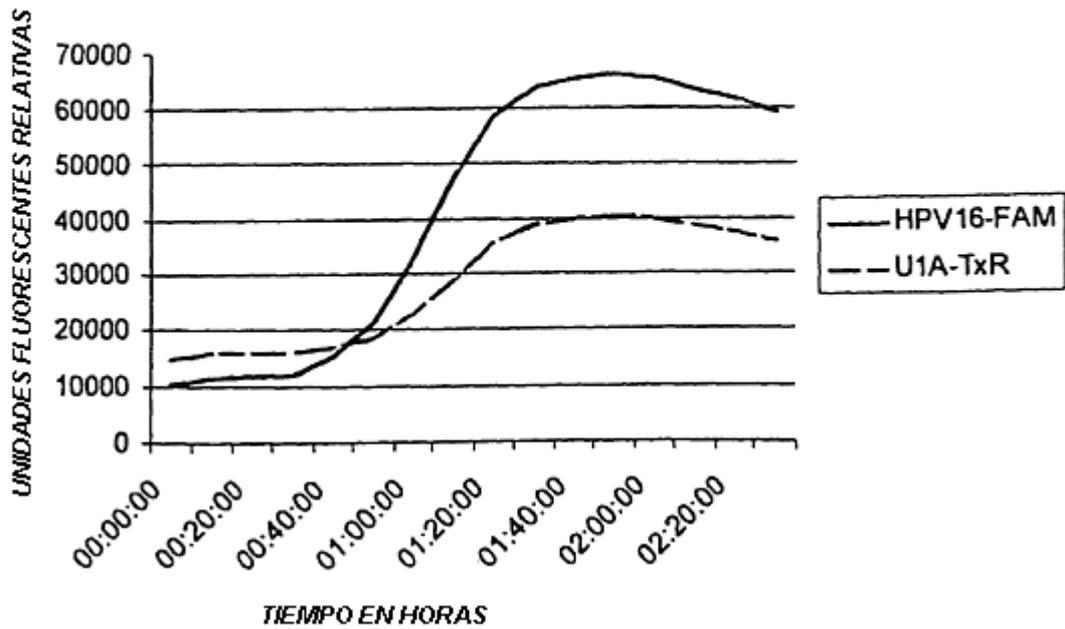


FIG. 2A.

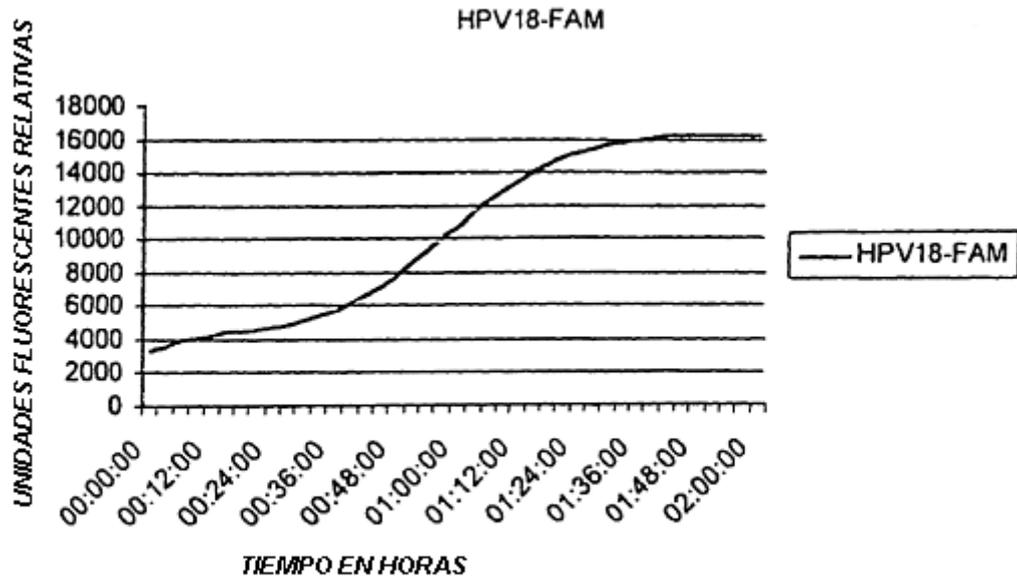


FIG. 2B.

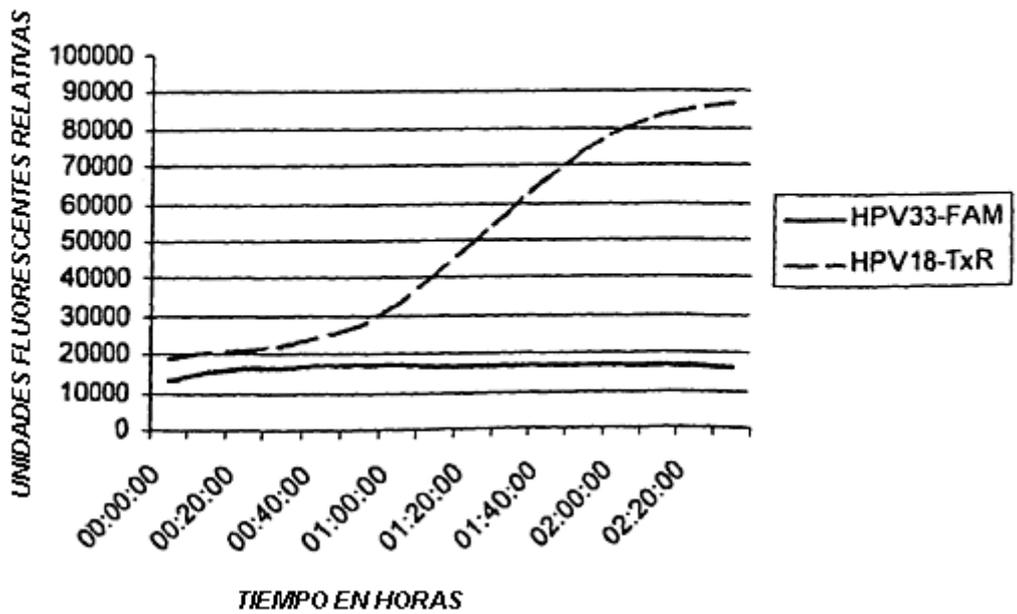


FIG. 3A.

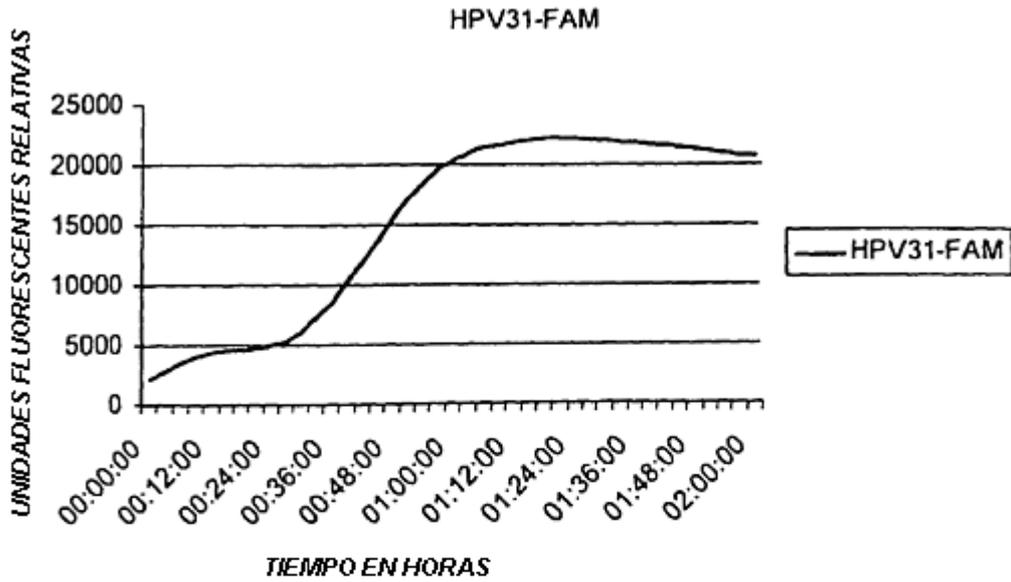


FIG. 3B.

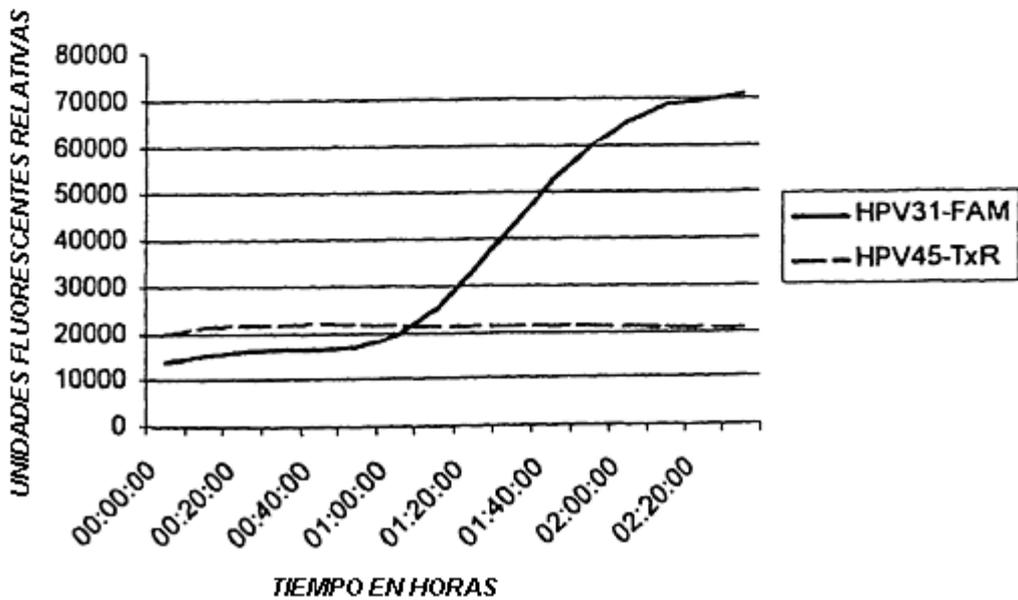


FIG. 4A.

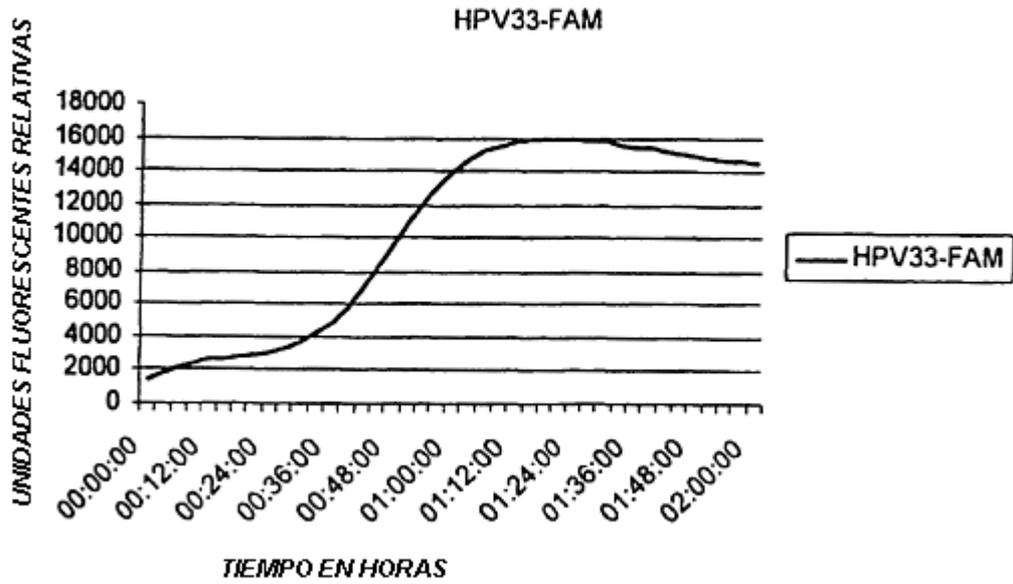


FIG. 4B.

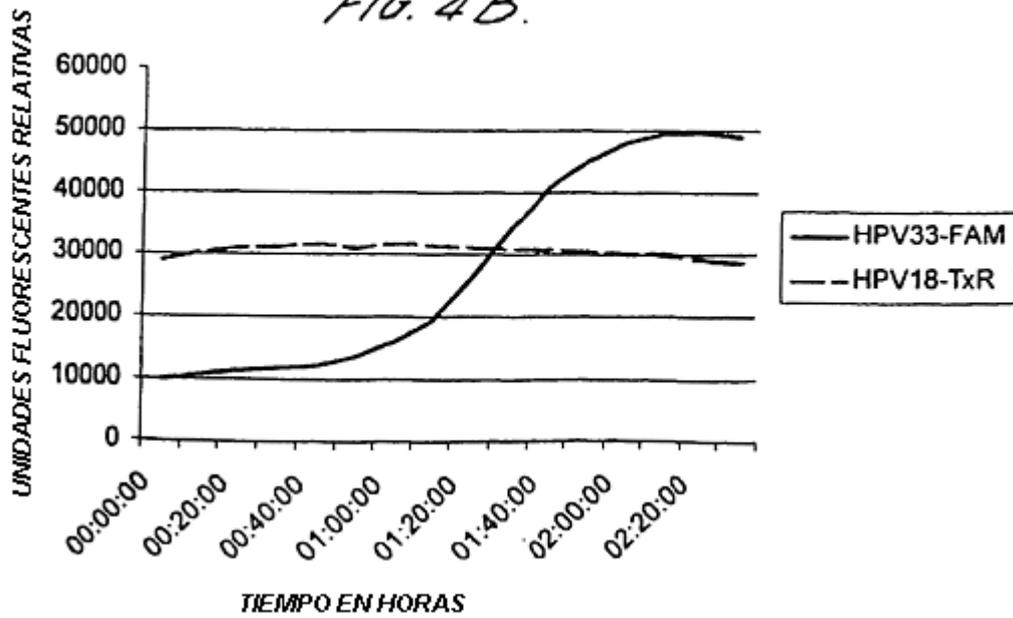


FIG. 5A.

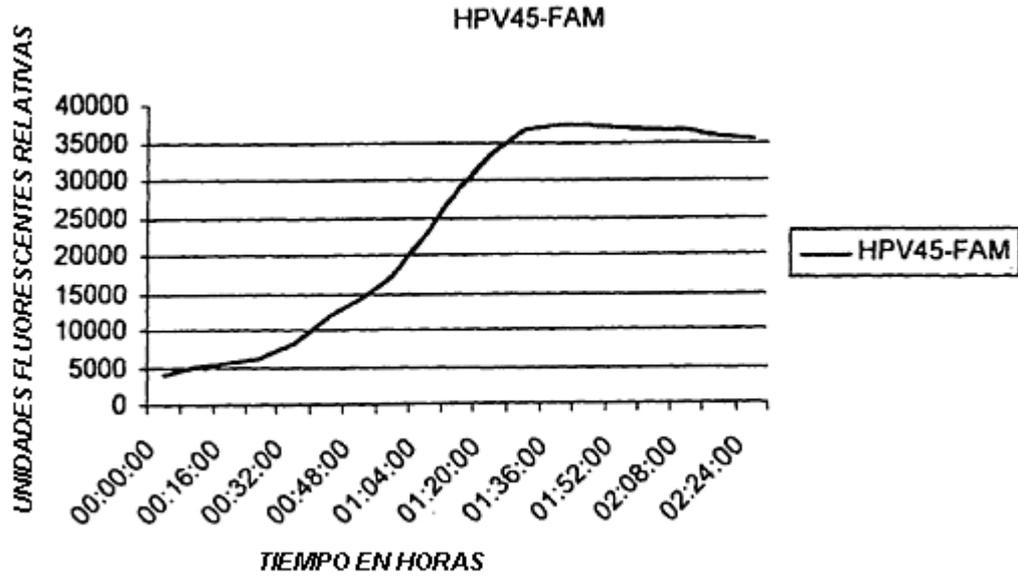


FIG. 5B.

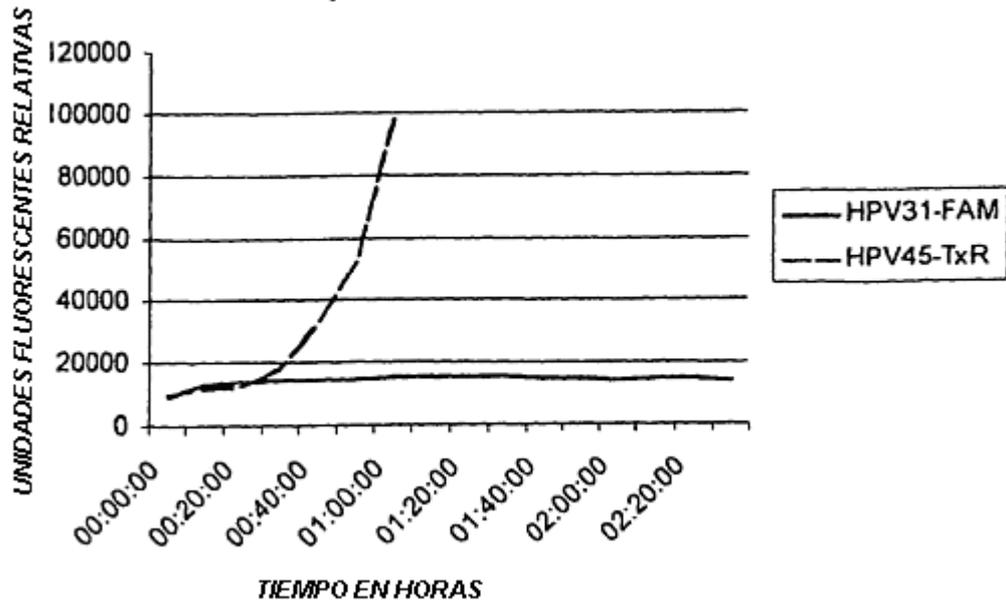


FIG. 6.

